ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

*TOME 19* *No. 3* *SEPTEMBRE 1960*

# SOME DATA CONCERNING THE PREPARATION OF INACTIVATED POLIOVACCINE ON AN EXPERIMENTAL SCALE

by

C. Ionesco-Mihăieşti, Al. Ciucă, I. Mesrobeanu, B. Wisner, Fl. Horodniceanu, Dina Sergiesco, R. Klein, M. Zamfirescu, G. Gancevici, R. Arion, I. Stoian, A. Fényves and N. Gaico

*(From the Dr. I. Cantacuzino Institute — Department of Poliomyelitis)*

— Received for publication on June 11th, 1960 —

In 1957, vaccination against poliomyelitis by means of a vaccine of the Salk type was started in Rumania. An imported commercial vaccine was used. During the year 1958, investigations were begun in the "Cantacuzino" Institute with a view to preparing inactivated poliovaccine. The first batch of vaccine, prepared on an experimental scale, amounted to 35.000 doses and was ready for use in 1959. From 1960 onward vaccine is going to be produced on a large scale.

At present, adequate information is available concerning the conditions to be fulfilled in the preparation of inactivated poliovaccine in order to warrant the innocuousness of the latter as well as its high antigenic potency. The study group of the W.H.O. (16) has stated the general requirements to be satisfied by any poliovaccine, but there still are wide differences concerning the methods of manufacture and, more particularly, the assessment of imunogenic potency.

Sven Gard (4) has shown that, as a rule, the variable results obtained in the assessment of antigenic potency of various poliovaccines are due to 4 factors, *viz* 1) the concentration of the virus in the initial suspension; 2) the potency of the strains used; 3) the method of inactivation applied; and 4) antigen losses during filtration. Following the Cutter incident in the U.S.A., the attention of vaccine producing laboratories has been more particularly concentrated on the innocuousness of vaccines, while the antigenic potency of the product has sometimes been left in the background.

In the investigations performed in the "Cantacuzino" Institute, an attempt was made to select optimum technical procedures, the experience gained by other vaccine-producing laboratories being duly taken into account. The aim pursued was to vouchsafe the innocuousness of the product as well as its potency.

In order to obtain the raw virus suspensions, the virus was cultured in trypsinized monkey kidney cell cultures. The kidneys were collected from monkeys of the species *Mac. rhesus*, *Mac. cynomolgus*, and *Cercopithecus aethiops*.

Cell cultures from the kidneys of these species are equally susceptible to the 3 types of poliovirus. By using trypsinization which results in abundant cell cultures, raw virus suspensions exhibiting a minimum titre of $10^{-7}$ could be obtained. T.C.M. 199 from which purine and pyrimide bases had been omitted was used as a culture fluid.

It must be emphasized that some of the vaccine-producing laboratories are still using the MAITLAND method for virus multiplication. This method, which was initially used for the cultivation of poliovirus on a large scale in view of vaccine production, has many shortcomings. In the first place, the virus yield is low and this may account for the low potency of some commercial vaccines. In the second place, large amounts of cellular proteins are released into the culture medium and may interfere with the process of inactivation. Finally, the method is rather expensive. All these findings are strong arguments for definitively abandoning this method.

For the preparation of the first batch of vaccine in our laboratory, the strains MAHONEY, $MEF_1$ and SAUKETT *) of well known antigenic potency have been used.

The use of the MAHONEY strain, as introduced and advocated by SALK (14, 15), has met with considerable criticism. On the ground of this strain being neurotropic and therefore inadequate for vaccine preparation, many investigators have substituted it by another strain of type 1 displaying reduced neurotropic properties. Attempts along these lines with certain attenuated strains have failed as regards antigenic potency. Among the strains with low neurotropic properties, the BRUNENDERS strain has been widely used in European laboratories, while in American laboratories the use of the MAHONEY strain has been maintained. At present, the safety tests to which poliovaccine is subjected completely exclude any risk of accidents. Thus, since the Cutter incident tens of millions of children have been immunized with inactivated vaccine containing the MAHONEY strain, and not a single case of poliomyelitis in which the vaccine could have been incriminated as the cause of the disease has been recorded. Therefore the use, for fear of possible accidents, of strains with a low neurotropism to the disadvantage of antigenic potency is quite unjustified. In the "Cantacuzino" Institute a batch of univalent type 1 vaccine was prepared by means of the BRUNENDERS strain. Its antigenic potency proved to be considerably inferior to that of vaccine containing the MAHONEY strain. Thus, the findings of British authors (13, 17) asserting the equivalence as regards antigenic potency of the BRUNENDERS and MAHONEY strains could not be confirmed. As a consequence we felt justified in continuing to use the MAHONEY strain.

One of the problems whose solution met with considerable difficulties was the filtration of virus suspensions. In the preparation of vaccine, filtration is an essential step (15) insuring homogenization of the virus suspension by the removal of virus aggregates which might contain infecting particles. Yet, inadequate understanding of the conditions governing poliovirus filtration and exaggerated repetition of the latter in the course of vaccine preparation are the main causes determining the low antigenic potency of some vaccines, as demonstrated by many investigators (2, 3, 4, 6).

*) We are indebted to Dr. J. Salk for kindly supplying these strains.

As a rule, Seitz filter pads are apt to retain considerable amounts of virus. Thus, per 1 cm² of filtering surface, EKS, $EKS_1$, and $EKS_2$ filter pads will completely adsorb the virus contained in 100 ml of a suspension possessing a titre of $10^{-7}$. As a consequence some laboratories have chosen either to reduce the number of filtrations, or to filter large volumes of virus suspension through small filtering surfaces. Both procedures are open to criticism.

In our laboratory, the method finally adopted consists in washing of the filter with a 0,3% gelatin solution, as recommended by British and Soviet authors (1, 10, 11). An amount of 10 ml per 1 cm² filtering surface will practically preclude virus retention.

*Table 1*

**Influence of filter upon virus titres**

| FILTER TYPE | WASHING | | VIRUS | | TITRE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | fluid | ml/cm² *) | strain | ml/cm² *) | before filtration | after filtration |
| Seitz $K_5$ | Hanks | 3/1 | Mahoney | 1.5/1 | $10^{-6.5}$ | $10^{-6.5}$ |
| Seitz EKS | M. 199 | 10/1 | ,, | 40/1 | $10^{-6,5}$ | 0 |
| Seitz $EKS_1$ | M. 199 | 10/1 | ,, | 50/1 | $10^{-6.5}$ | 0 |
| Seitz $EKS_1$ | Gelatin 0.3% M. 199 | 10/1 7/1 | ,, | 1.6/1 | $10^{-7}$ | $10^{-6.5}$ $10^{-7}$ |
| Seitz $EKS_2$ | M. 199 | 10/1 | ,, | 40/1 | $10^{-6.5}$ | 0 |
| Glass filter Jena $G_5$ | M. 199 | 10/1 | ,, | 40/1 | $10^{-7}$ | $10^{-7}$ |
| Collodion filter Göttingen $G_1$ | Gelatin 0.3% M. 199 | 5/1 7/1 | Saukett | 1.3/1 | $10^{-7}$ | $10^{-7}$ |

*) Ratio between amount of fluid and filter surface.

Table 1 shows the results of some experiments related to the selection of a filtering method. Seitz EKS, $EKS_1$ and $EKS_2$ filter pads completely retained the virus. Treatment of $EKS_1$ filter pads with a 0,3% gelatin solution prevents virus adsorption, titres after filtration of 1,6 ml per 1 cm² of filtering surface equalling the figures obtained before filtration. In some cases it may be seen that even after the passage of large amounts of virus suspension through Seitz filter pads treated with gelatin the decrease of virus concentration will not exceed 0,5 log units.

Very good results have been obtained with Göttingen $G_1$ collodium filtering membranes which do not adsorb virus at all and whose small pores are

sure to retain any aggregates. At present we are attempting to substitute collodium membranes for Seitz filters throughout, Seitz $K_5$ asbestos filters being, however, maintained for a preliminary clarifying filtration of the suspensions.

A study of the inactivation rate of the virus at 37°C, pH 7—7.2, in the presence of formol in a 1/4.000 concentration, shows the infecting titres of type 1 and type 3 viruses to reach the base-line after 43—91 hours. Tests for the absence of live virus on the 6th and 12th day (end of the period of inactivation) yielded satisfactory results in the case of type 1 and type 3 viruses.

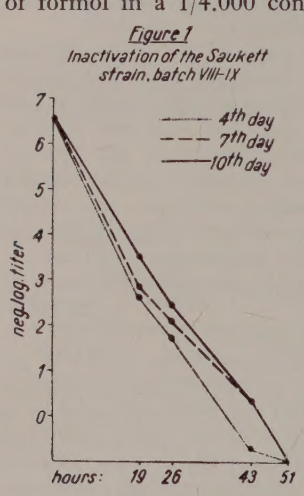


Fig. 1

Type 2 virus (strain MEF$_1$) appears to be more resistant to the action of formaldehyde, as 2 univalent batches still contained live virus at the end of 12 days of inactivation. Titrations performed in order to determine the rate of inactivation in these batches showed 1/10 of the tubes still to contain live virus after 72 hours. In these cases the formol concentration was readjusted and the period of inactivation prolonged for another 4 days, after which, tests in tissue cultures became negative.

On performing safety tests in tissue cultures, the cytopathogenic effect of type 2 virus which had maintained its activity at the end of 12 days of inactivation was found to appear in the flasks after 8 days, while poliovirus which has not been subjected to the action of formaldehyde will exert its cytopathogenic action after 5—6 days at the utmost, even in high dilutions. Careful investigations concerning the time of appearance of the cytopathogenic effects of various samples of virus subjected to the action of formaldehyde resulted in the confirmation of MC LEAN and TAYLOR's findings (12) pointing to the existence of a delayed cytopathogenic action in such cases.

Figure 1 shows the inactivation of a batch of SAUKETT virus. The rate of inactivation is seen to change significantly according to the moment at which the tubes in which titrations of infectiousness have been performed are read (4th, 7th, or 10th day).

The shift on the axis of ordinates will appear only in samples which have been exposed to the action of formaldehyde for 19 hours at least, while at 0 time the titres are unchanged on the 4th, 7th and 10th day. The same phenomenon is more obviously expressed in Table 2.

For all 3 virus types the delay in the appearance of the cytopathogenic effect is directly proportional to the duration of formol action. These findings imply the requirement of following up over long periods (21 days) the cultures used for safety tests.

In the manufacturing of a trivalent vaccine the following factors were taken into account: 1) the incidence rate of the 3 types of poliovirus in our country; 2) the different antigenic potencies of the 3 types of poliovirus. Thus, it has been shown in previous investigations (7,9) that type 1 occurs at the

*Table 2*

**Titre increase of formalin-treated poliovirus after prolonged incubation in tissue cultures.**

| Virus tested | Duration of formalin action (hours) | Days of incubation | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 4 | 7 | 10 |
| MAHONEY, batch VI—VII. | 0 | 6.71 | 6.71 | 6.71 |
| | 19 | 2.56 | 2.62 | 2.92 |
| | 26 | 1.29 | 1.73 | 1.81 |
| MRF$_1$, batch IV | 0 | 6.44 | 6.44 | 6.44 |
| | 19 | 3.08 | 3.25 | 3.43 |
| | 26 | 0.55 | 0.68 | 0.78 |
| SAUKETT, batch VIII—IX | 0 | 6.55 | 6.55 | 6.55 |
| | 19 | 2.62 | 2.84 | 3.48 |
| | 26 | 1.71 | 2.08 | 2.40 |
| | 43 | 0.21 | 0.37 | 0.37 |

rate of 84—96% of the cases, types 2 and 3 being met with at rates of 0.9—2.27% and 2.6—13% respectively. The high incidence rate of cases due to type 1 was also confirmed by an investigation on the presence of antibodies in former poliomyelitis patients (8). On the other hand, type 1 displays the lowest antigenic potency, as compared to type 2 which possesses the highest potency and type 3 which holds an intermediate position. For these reasons we have adopted the proportion of 3 parts type 1,1 part type 2,2 parts type 3, which yielded satisfactory results. The method used by certain commercial manufacturers, consisting in the pooling of equal amounts of the 3 virus types to yield a trivalent vaccine, is objectionable, as it does not take into account the low antigenic potency of type 1, nor does it consider the incidence rates of the poliovirus types in the population which is to be immunized.

The trivalent batch was subjected to safety tests *in vitro* and *in vivo*, with satisfactory results. *In vivo* tests were carried out in 20 monkeys according to the indications of the W.H,O, study group (16).

Potency tests set the most controversial problem within the pattern of vaccine testing. Thus, in the U.S.A. and in Great Britain the vaccine is tested in monkeys, in continental Europe the guinea-pig has been more widely used, and latterly chickens as well as *in vitro* tests have been resorted to. The lack of an international standard method stating the animal, the type of immunization, and the statistical method of estimating the results leads to discordances between the findings of different laboratories.

Nevertheless, the simultaneous testing of several vaccine samples and of live virus in an adequate number of animals will lower the chances of error.

The method used in the "Cantacuzino" Institute and adopted at present in the standard preparation of vaccine is based upon the calculation of the limit of antigenic extinction of the vaccine in guinea-pigs (according to SVEN GARD (5). For this purpose the animals are given 2 subcutaneous injections of 1 ml each, at an interval of 2 weeks, and bled after another 2 weeks. At least 10 sera are tested for each vaccine dilution, and the presence or absence of polio-antibodies versus 100 $DCP_{50}$ of the virus strains MAHONEY, SAUKETT, and $MEF_1$ are separately determined in each serum.

*Table 3*

**Antigenic extinction values * of several inactivated poliovaccines**

| VACCINE | TYPE 1 | TYPE 2 | TYPE 3 |
|---|---|---|---|
| Exp. batch Inst. Cantacuzino . . . . . | 1.62 | 2.14 | 1.52 |
| Foreign 1, adsorbed on to $Al(OH)_3$ . . . . . | 1.09 | 1.68 | 1.17 |
| Foreign 2, prepared in Maitland cultures. . . | 0.68 | 1.50 | 2.38 |
| Foreign 3, strain type 1 Brunenders . . . . | 0.50 | 1.58 | 2.22 |
| Live virus — same batch as exp. one. Stored at + 4 °C . . . . . | 2.38 | 2.00 | 2.50 |

*) Calculated according to Reed and Muench.

Table 3 shows the results of potency tests of the vaccine prepared in the "Cantacuzino" Institute, as compared to 3 samples of commercial vaccine and to a trivalent pool in the same proportions of the live viruses used in the preparation of the respective vaccines kept at + 4°C.

It may be seen from this table that some of the commercial vaccines tested display a low potency as regards virus type 1. This finding cannot be accounted for by inadequate conditions obtained during the transport of imported vaccines or by errors of determination, since the corresponding figures for types 2 and 3 are, as a rule, satisfactory. On the ground of the data reported above, the reduced potency of type 1 in commercial vaccines may be attributed to the low concentration of type 1 virus particles due to: 1) low virus titres in the initial suspension, especially when the MAITLAND method has been used for virus multiplication, as in the case of commercial vaccine No. 2; 2) repeated filtration under inadequate conditions; 3) the practice of certain commercial manufacturers, consisting in dilution of the virus suspension down to the lower limit required by the national standard ($10^6$); and, finally, 4) irrational trivalent pooling.

In addition, weakly antigenic strains are sometimes used, as in the case of commercial vaccine No. 3.

It should be noticed that commercial vaccine No. 1, prepared with the MAHONEY strain and adsorbed on to $Al(OH)_3$ is not more antigenic, a fact which casts some doubts on the necessity of using the adjuvant.

As a rule, the figures for types 2 and 3 are satisfactory in all vaccines, owing to the high initial potency of these strains as compared to type 1, as well as to the presence in some of the imported vaccines of proportionately larger amounts of type 2 and type 3 suspension.

Our findings confirm those of Sven Gard (4) who recorded the low antigenic potency of several commercial vaccines. This calls for the establishment of international standards for the assessment of antigenicity, as well as for the preparation of reference vaccines, as planned by the W.H.O. The possible use of weakly antigenic vaccines could thus be avoided.

At present, the serological response is investigated in a group of 150 children among 16.000 to whom the vaccine has been administrated.

REFERENCES


1. Andjaparidze O. G. and Soloviev V. D. — Voprosî Virusologhii 1959, **5**, 537.
2. De Sommer P. — Ann. Soc. Belge de Méd. Trop., 1958, **38**, 311.
3. Gard S. — IV Symposium-Europ. Assoc. Poliomyelitis, Bologne, 1956, p. 17.
4. Gard S. — V Symposium-Europ. Assoc. Poliomyelitis, Madrid, 1958, p. 42.
5. Gard S. — Archiv für die gesamte Virusforsch., 1958, **8**. 411.
6. Goldblum N. and Mercado A. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1959, **100**, 276.
7. Ionesco-Mihăieşti C., Sergiesco D., Klein R., Horodniceanu F., Zamfiresco M. and Buimovici E. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiol., 1957, **16**, 171.
8. Ionesco-Mihăieşti C., Sergiesco D., Klein R., Horodniceanu F., Marcovici M., Buimovici E., Calomfiresco R. and Ababei R. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie. 1958, **17**, 5.
9. Ionesco-Mihăieşti C., Wisner B., Buimovici E., Marcovici M., Băcanu C., Dona D., Zamfiresco M., Pleceaş P. and Moraru E. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **18**, 485.
10. Kanarek A. D., Goffe A. P., and Woiwod A. J. — Personal Communication.
11. Laskevici V. A. — 2-a Naucinaia Sesia Instituta po Izvuceniu Poliomielita amn—sssr, Moskva 1957, p. 42.
12. Mc Lean W. Jr. and Taylor A. R. — Progress Med. Virol., S. Karger New-York, 1958, p. 122.
13. Perkins F. T. — Brit. J. Exp. Path. — 1957, **38**, 542.
14. Salk J. — J. Am. Med. Assoc 1953, **151**, 1081.
15. Salk J. — American J. Publ. Health 1956, **46**, 1.
16. who/B.S./I.R./44 — 1958, — Study Group on Recommended Requirements for poliomyelitis.
17. Wood W. — IV Symposium Europ. Assoc. Poliomyelitis Bologne 1956, p. 32.


## QUELQUES DONNÉES CONCERNANT LA PRÉPARATION SUR ÉCHELLE EXPÉRIMENTALE DU VACCIN POLIOMYÉLITIQUE INACTIVÉ,


RÉSUMÉ

Les auteurs donnent une description des procédés utilisés au cours de la préparation du vaccin poliomyélitique inactivé, en insistant sur certaines étapes, essentielles pour l'obtention d'un produit de valeur antigénique satisfaisante.

Les remarques faites concernent les caractères antigéniques des souches de virus utilisées, la technique de la filtration, le processus de l'inactivation et le choix des proportions pour le mélange trivalent.

Les tests d'antigénicité effectués parallèlement avec plusieurs échantillons de vaccins commerciaux importés, ont confirmé la valeur antigénique du lot expérimental préparé.

## ОПЫТ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОЛИОМИЭЛИТА, В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы описывают способ изготовления инактивированной вакцины против полиомиэлита, причем останавливаются детально над моментами существенными для получения препарата, обладающего соответствующими антигенными свойствами.

Обсуждается антигенность применяемых штаммов вируса, методика фильтрации, процесс инактивирования и количества, входящие в тривалентную смесь.

Антигенная ценность экспериментальной серии вакцины подтвердилась на основании результатов, полученных в испытаниях, проведенных параллельно с образцами импортных коммерческих вакцин.

## EINIGE ANGABEN ÜBER DIE EXPERIMENTELLE HERSTELLUNG VON INAKTIVIERTEM POLIOMYELITISIMPFSTOFF

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser beschreiben die von ihnen zu Herstellung eines inaktivierten Poliomyelitisimpfstoffes angewendeten Verfahren, unter besonderer Berücksichtigung einiger zur Erzielung einer entsprechenden antigenen Wirksamkeit wesentlichen Produktionsphasen.

Besprochen werden in dieser Hinsicht die antigenen Eigenschaften der Virusstämme, das Filtrierungsverfahren, der Inaktivierungsprozess und die Wahl der entsprechenden Mischungsverhältnisse.

Die gleichzeitig mit verschiedenen aus dem Handel importierten Polioimpfstoffen durchgeführten vergleichenden Antigenitätsproben bestätigten die antigene Wirksamkeit des experimentell hergestellten Produktes.

# L'OBÉSITÉ ASSOCIÉE AU DIABÈTE DANS UNE COLONIE DE SOURIS BLANCHES

par

St. M. Milcou, Al. Pop, A. Lupulesco, Isabela Potop, Al. Turburi, Alis Oprişan et Elena Nedelniuc

*(Travail de l'Institut d'Endocrinologie « Prof. Dr. C. I. Parhon » et de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service Vétérinaire)*

— Manuscrit reçu le 12 avril 1960 —

Les acquisitions étio-pathogéniques, biochimiques, hormonales et morphologiques, obtenues à la suite des observations et recherches effectuées sur les souris et rats avec diverses formes d'obésité spontanée ou expérimentale, ont profondément influencé les conceptions actuelles concernant l'obésité, syndrome si complexe du point de vue clinique chez l'homme (2, 3, 7, 9).

On connaît plusieurs groupes et formes d'obésité observés chez la souris:

a) *Obésités métaboliques*: 1. obésité hyperglycémique (INGALLS et coll. (5)) observée à la suite de l'hybridation des mâles de la souche V avec des femelles provenant du croisement V × $C_{57}$ $Bl_6$. Selon les auteurs ce syndrome, qui présente le plus vif intérêt, est déterminé héréditairement par la gène „Ob" et n'apparaît que chez les homozygotes „« Ob Ob »", car le caractère « obèse » est récessif. La gène « Ob » aurait une action biochimique (4), induisant le blocage primaire partiel de l'acétate dans le métabolisme intermédiaire et un blocage secondaire de l'hexokinase par l'intermède hormonal du glucagon, produit en excès par l'hyper-réactivité du pancréas insulaire. Ces souris dépassent rapidement de 2—3 fois le poids normal.

2. L'obésité héréditaire des souris jaunes (3,9) déterminée par la gène $A^y$, à caractère dominant est rencontrée seulement chez les hétérozygotes, la gène $A^y$ actionnant comme facteur léthal à l'état homozygote.

3. L'obésité spontanée hypothalamique (8,9) dont le mécanisme d'apparition est inconnu.

4. L'obésité spontanée chez une souche de souris agouti (NZC) élevée en Néo-Zélande (1), reproduites en conditions de consanguinité pendant plus de 10 générations.

b. *Obésités de réglage* dues: 1. à la perturbation du mécanisme central de la faim et de la satiété, avec localisation dans les noyaux hypothalamiques, à étiologie variée, selon qu'elles sont dues à une lésion chimique (avec de l'aurothioglucose) ou à une lésion électrolytique des noyaux (9).

2. On mentionne aussi des obésités de nature alimentaire, dues à l'ingestion exagérée des lipides chez les souris appartenant aux souches $C_3H$ et A (9).

Dans le présent travail, on a étudié les cas d'obésité spontanée avec hyperglycémie, survenus dans un élevage de souris blanches, chez les descendants d'une souche H. Le phénomène n'a pu être décelé sur d'autres souches du même élevage (R.A.P. et Albino Rosso-souris blanches et DBA et $C_{57}$Bl-souris colorées).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les observations ont été effectuées pendant deux années sur un lot permanent de 10.000 souris de reproduction de souche H (90% femelles et 10% mâles), en poursuivant la fréquence, la manière et les conditions d'apparition de l'obésité en fonction des facteurs extérieurs et l'évolution des cas.

Les animaux obèses étaient immédiatement séparés du reste de l'effectif et étudiés individuellement ou par lots de 5—10 individus.

Les observations concernent l'alimentation, le poids corporel et sa variation, le métabolisme basal, l'iodocaptation (13), l'éosinogramme, la vie sexuelle, la reproduction et l'état physiologique de l'appareil reproductif par l'étude du cytogramme vaginal, l'activité volontaire et réflexe, la résistance au jeûne et au froid.

L'exploration biochimique des troubles manifestés par ces animaux a été effectuée par l'étude de:

la glycémie et glycosurie (méthode HAGEDORN-JENSEN); cholestérolémie (méthode SACHETT); pyruvicémie (méthode MARKES); lipidémie (méthode SCHMIDT-THANHAUSER); glycogène hépatique (méthode GOOD-SOMOGY); l'acide pyruvique hépatique (méthode MARKES).

On a déterminé l'indice de l'iode, l'indice de saponification, ainsi que le point de fusion de la graisse chez les souris normales et obèses.

De même, on a étudié l'action de certains hormones sur le métabolisme glucidique (cortisone, somatotrope, thyroxine, insuline, adrénaline, hexestrol), en conditions déterminées de dosage et de durée. (11, 12).

Les données cliniques, biochimiques et hormonales ont été mises en corrélation avec l'étude des modifications morphologiques des glandes endocrines (6), des organes parenchymateux et du cerveau (8).

Comme recherches biologiques spéciales, on a essayé l'éventuelle précision du caractère héréditaire du syndrome. A cette fin, on a appliqué le système de la consanguinité directe (étroite) pendant 4 générations à partir des descendants issus d'une des 3 gestations signalées chez les obèses.

## RÉSULTATS

1. *Données cliniques.* L'installation où on exploite la souche H est adéquate au but. L'élevage se fait par lots de maximum 10 individus, dans des bocaux en verre. La ration de base des animaux de reproduction pendant toute l'année consiste en 4 g de pain, 4 g de lait et 8 g d'avoine par jour en ajoutant un supplément de 1 g semence de tournesol une fois par semaine et quotidiennement 1 g de verdure (salade, épinards, lucerne) ou un succulent (carottes). Les principes alimentaires de la ration représentent approximativement: 16% protéines, 4% graisses et 60% glucides.

La reproduction se fait sur base de polygamie. Le poids moyen normal des animaux adultes est d'environ 30 g pour les femelles et 34 g pour les mâles. La fertilité ne dépasse pas 80% et la prolificité, 3—9 individus à chaque mise bas.

Du point de vue épidémiologique on enregistre dans l'élevage une mortalité de 2—3% par infections de Salmonella, de streptocoques et on présume la présence des porteurs de virus chorio-méningés et ectromélique, qui participeraient de façon latente au maintien de l'indice de mortalité. La souche H paraît assez susceptible aux infections chroniques (abcès streptococciques sous-cutanés et des ganglions périphériques) qui déprecient la valeur des animaux.

L'apparition de l'obésité est tardive; elle n'a été observée que chez les animaux adultes et presqu'exclusivement chez les femelles (sur 363 cas étudiés, on a signalé seulement 3 cas chez les mâles, soit 0,8%). L'incidence réduite chez ces derniers est due au fait que les mâles sont livrés à des fins expérimentales avant leur maturité (10—18 g). Pour cette raison la fréquence du syndrome a été rapportée seulement à l'effectif reproducteur.

Les cas d'obésité apparaissent sporadiquement durant toute l'année. Au début les éleveurs considèrent les souris comme gestantes, car la déformation de l'abdomen simule la gestation. Le poids moyen des animaux obèses a été de 68 g avec des variations allant de 45 g à 114 g. Chez un certain nombre d'animaux, on a pu suivre l'ascension de la courbe pondérale pendant la phase dynamique de l'évolution du syndrome (20—30 g par semaine) jusqu'à la phase stationnaire individuelle. La longueur du corps des obèses est sensiblement rapprochée de celle des normaux (19—20 cm par rapport 17.1/2—18 cm). — (Photo. 1).

On a observé une réduction importante des mouvements volontaires. Les femelles, mises en contact pendant 4—6 mois avec des mâles normaux, sont restées stériles. On a observé seulement trois cas de gestation dans la phase dynamique du syndrome. La prolificité a été réduite (2—3 jusqu'à maximum 8 souriceaux), les souris étant aptes à les nourrir. La survie des animaux à obésité déclarée n'a pas dépassé 3 mois.

Parfois l'obésité a pris un caractère monstrueux, avec déformation de la région cervicale et abdominale, la circonférence de ces régions dépassant 2—3 fois la taille normale, la tête gardant sa dimension normale.

L'obésité n'a été observée que parmi les animaux adultes, après 2—4 gestations antérieures, le syndrome apparaissant brusquement d'une semaine à l'autre, ce qui prête à confusion avec la gestation même.

Cliniquement, les animaux obèses présentent un prurit „*sine materia*" et parfois de petites zones de dépilation (Photo. 2) dans la région dorsale où la peau est souvent recouverte de croûtes. Le poil des obèses perd son lustre et devient grisâtre.

2. *Essais de caractériser la nature héréditaire éventuelle du syndrome.* L'obésité a été observée chez les animaux de reproduction de la souche H comme un phénomène spontané, avec une fréquence relative de 363 cas sur un effectif permanent de 10.000 animaux pendant 2 années, donc une moyenne annuelle de 181 cas étudiés (1,81%). Les conditions de milieu et d'élevage ont été les mêmes que pour les autres souches, où le syndrome ne s'est pas manifesté.

La recherche de la genèse a été faite pendant 1.1/2 année, par reproduction consanguine des descendants d'une femelle obèse (ayant atteint le poids

de 86 g). Initialement on a constitué 2 couples, frère et sœur, base qui a servi à la reproduction des générations ultérieures. On a appliqué par 16 fois la formule de reproduction mère et fils. L'étude poursuivie pendant 18 mois concerne 210 animaux adultes (160 femelles et 50 mâles). Pendant cette période les femelles ont été 3—6 fois gestantes. Une partie des descendants (20—30%) a été perdue pendant l'allaitement à cause d'une débilité congénitale.

*Photographie* 1. Aspect comparatif d'une souris normale ( - 29♀g) et obèse ( + 88♀ g), du même âge, souche H

Les résultats concernant l'obésité ont été négatifs, attendu qu'aucun animal n'a dépassé 40 g (poids maximum atteint par certains individus âgés de 11—13 mois). La longévité a été de maximum 13 mois (par rapport à 16 mois chez les témoins), ce qui reflète une fois de plus un certain état de débilité constitutionnelle de la souche.

3. *Essais de mettre en évidence une infection latente du système nerveux comme facteur pathogène.* L'hypothèse d'une éventuelle lésion du système nerveux, tout spécialement de l'hypothalamus, par un facteur virotique latent supposé chez les souris de la colonie H, a déterminé 8 tentatives à fin de dépister cet agent dans le système nerveux ou dans la totalité des organes parenchymateux et du sang, des 8 groupes de 4— 5 animaux obèses. Les organes de ces souris ont été étudiés aussi du point de vue histologique.

Le filtrat (filtre Seitz EK) et les émulsions d'organes de 8 groupes de souriceaux obèses ont été inoculés séparément par voie intracérébrale à des groupes de 3 souriceaux pesant 10—12 g. Les organes provenant de 2 des 8 groupes (initiaux) de souris obèses ont été passés à 7 reprises par des souris saines (passage aveugle) tous les huit jours. Les résultats ont été constamment négatifs, tant du point de vue clinique, morphologique que virologique.

*Photographie* 2. Aspect de la peau dans la région dorsale, avec zones de dépilation, recouverte de croûtes fines ( - 84♀g)

4. *Déterminations cliniques.* a) *L'activité thyroïdienne* a été déterminée par l'étude du métabolisme basal et de l'iodocaptation $J^{131}$.

Les obèses (32 déterminations) présentent un métabolisme basal de 73,19±5 calories $m^2$, par rapport à 99,84±20 cal. $m^2$ chez les témoins (12 déterminations).

Iodocaptation $J^{131}$: on a administré par voie intrapéritonéale à 10 obèses et 10 témoins, 3,25 microcuries $J^{131}$. La fixation de $J^{131}$ dans la thyroïde s'est produite approximativement dans le même intervalle chez les deux groupes (5 heures), étant un peu plus réduite chez les obèses (32—33%) par rapport aux témoins (40—42%).

Par conséquent, l'activité de la thyroïde est plus réduite chez les obèses que chez les animaux témoins.

b) *L'activité des surrénales* a été étudiée par la réaction de THORN, en administrant 2,5 mg ACTH aux deux groupes. L'éosinogramme a été chez les obèses (36 déterminations) en moyenne de 73,44% par rapport à 47,23% chez les témoins (15 déterminations).

L'activité des surrénales apparaît donc beaucoup plus diminuée chez les obèses.

c) *L'activité sexuelle* (cytogramme vaginal). La fonction de reproduction a pratiquement cessé chez tous les animaux dans la phase d'état d'obésité. Les mâles normaux, introduits parmi les femelles obèses,qui ne manifestent apparemment pas de libido, sont repoussés et mordus.

L'étude du cytogramme vaginal — frottis colorés, (méthode de Shorr)— a mis en évidence chez un grand nombre de femelles, des aspects individuels, pouvant se grouper en 3 catégories:

— avec cycle normal (durée 5—6 jours) — 15%

— œstrus prolongé (24—26 heures) — 35%

— œstrus très prolongé (6—9 jours) et autres irrégularités dans les autres phases du cycle — 50%.

Les caractères du cycle plaident assez clairement pour l'absence de fécondité.

L'administration de gonadotrope (5 U. glanduitrin) normalise le cycle chez les obèses à œstrus permanent.

d) *L'activité réflexe* a été étudiée par le réflexe de défense. Par rapport aux témoins (24 déterminations) chez qui le réflexe de défense se manifeste en moyenne en 10" 21, chez les obèses (47 déterminations) il apparaît avec un retard évident (en moyenne 23" 49).

e) *L'activité volontaire* appréciée par observation libre, montre que les obèses sans être totalement sédentaires, ont une activité beaucoup plus réduite que les témoins.

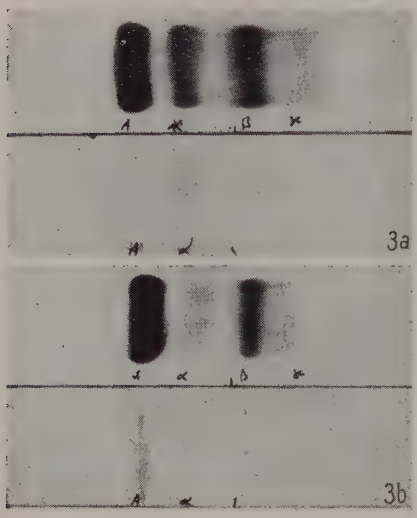
f) *Résistance au jeûne.* Un groupe d'obèses soumises au jeûne, sans réduction de l'eau, ont perdu 15—23 g du poids et sont mortes dans 6—7 jours. Les témoins, en nombre égal, n'ont résisté que 6 jours avec perte pondérale de 10 — 12 g. Les résultats ne sont pas significatifs.

g) *Résistance au froid.* 10 obèses, exposées à la température de $+8^0$ C sont mortes après 5—8 heures (incapacité de thermoréglage), tandis que les témoins observés pendant 24 heures n'ont présenté aucun trouble.

5. *Déterminations biochimiques.* a) *Glycémie chez les obèses* (alimentées ad libitum). Sur 53 déterminations, on a enregistré une glycémie en moyenne de 151 mg % $\pm$ 24 mg %, variant entre 116—175 mg %. Environ 20 % des obèses ont eu la glycémie à la limite supérieure de celle présentée par les témoins. Chez les obèses soumises au jeûne pendant 12 heures (28 déterminations) la glycémie a varié entre 110—143 mg %. Chez un groupe de témoins (10 déterminations) la glycémie a varié entre 92—114 mg % (102 mg % en moyenne); néanmoins,

on trouve parmi les individus apparemment normaux des valeurs glycémiques atteignant celles présentées par les obèses.

b) *Glycosurie*, déterminée sur des groupes de 5 animaux obèses, les valeurs oscillant entre 581—760 mg %.




*Photographie* 3. Lipidogramme du sérum sanguin:

*a)* souris normale: les lipides migrent avec la fraction α-globulinique

*b)* souris obèse: les lipides migrent avec la fraction séro-albuminique.

c) *Cholestérolémie* — 10 déterminations sur obèses avec 157 mg% en moyenne (témoins 92 mg %).

d) *Pyruvicémie chez les obèses* (12 déterminations) en moyenne de 8,72 mg % et chez les témoins 5 mg %.

e) *Lipidémie totale* de 744 mg% en moyenne chez les obèses et de 543 mg % chez les témoins.

L'analyse chimique des graisses a montré qu'elles sont composées surtout de graisses neutres.

6. *L'étude électrophorétique des lipides sanguins.* On a effectué l'électrophorégramme du sérum sanguin sur un groupe de 5 animaux normaux (du point de vue clinique et biochimique) et sur un groupe de 5 obèses. Chez les souris normales les lipides sanguins sont associés et migrent avec les α globulines, (Photo 3 a), tandis que chez les obèses (Photo 3 b) les lipides sont conjugués à la fraction albuminique du sérum.

7. *Action des hormones sur la glycémie.* a) *Thyroxine*: administrée en dose de 1 mg/kg par voie souscutanée et les déterminations ont été faites après 2 heures. Chez les obèses (14 déterminations) on a enregistré une moyenne de 8,1 mg % et chez les témoins (7 déterminations) 8 mg %.

b) *Cortisone*: administrée en dose de 2,5—5 mg (intrapéritonéale) et les déterminations ont été faites après 12 heures. La glycémie chez les obèses et témoins n'a pas subi de modifications par rapport aux valeurs normales.

c) *Corticotrophine:* (ACTH) en dose de 12,5 mg (intrapéritonéale); les déterminations ont été faites après 12 heures, 10 jours de suite. Les valeurs enregistrées montrent le 4-e jour une hausse de la glycémie allant jusqu'à 216 mg%. En même temps, on a constaté une mortalité de 40% parmi les animaux traités. La glycosurie a enregistré des valeurs élevées, atteignant 110,7 mg % à la fin de la période de recherches.

d) *Adrénaline:* Chez les animaux nourris à discrétion. 1 mg/kg n'a pas influencé la glycémie chez les obèses après 2 h.

e) *Somatotrope:* agit très inégalement sur la glycémie. On a effectué 40 déterminations sur les obèses et témoins, en leur administrant par voie intrapéritonéale 5 U. du préparé; l'effet a été noté après 12, 48, 96 heures et 6, 10 jours. De 4 préparés testés, un seul a provoqué chez les obèses une hyperglycémie nette, après

2 à 6 jours; à des valeurs atteignant 187 mg %, les témoins n'étant pas influencés.

f) *Hexoestrol:* administré par voie souscutanée en dose de 0,05 mg aux obèses et témoins, n'a pas modifié la glycémie après 12 h.

g) *Insuline:* administrée en différentes doses, à des groupes de 6 à 8 animaux: les obèses (20 déterminations), nourries à discrétion, résistent sans présenter de convulsions à 1—2 U insuline/kg, corps malgré une baisse de la glycémie jusqu'à 37 mg%.

Les témoins résistent à 0,25 U insuline/kg corps, mais ne survivent pas à 1—5 U insuline kg/corps et meurent avec convulsions au cours des premières deux heures.

Les obèses, gardées à jeûne pendant 12 heures, résistent à 1 U/kg, mais meurent avec des convulsions après 5—20 U/kg, la glycémie baissant sous 23 mg %.

8. *Déterminations biochimiques dans les organes.* a) La réserve de glycogène dans le foie des obèses a varié entre 414—920 g %, la moyenne chez les témoins a été de 1412 mg%.

b) L'acide pyruvique dans le foie a été chez les obèses, en moyenne, de 8,62 mg % et de 26 mg % chez les témoins.

9. *Déterminations physico-chimiques sur la graisse des souris.*

| | obèses | normales |
|---|---|---|
| indice de l'iode | 87,9 | 87,3 |
| indice de saponification | 204 | 201 |
| point de fusion | 18°C | 18°C |

10. *Observations anatomo-pathologiques.* L'autopsie des animaux obèses relève que l'excès du volume corporel est dû aux immenses dépôts de graisse blanche, se trouvant en grandes quantités sous la peau dans la région cervicale et scapulaire et celle du train postérieur. La déformation de l'abdomen est due aux grandes quantités de graisse, déposées au niveau des ligaments larges, périrénal, sous-péritonéal et dans le mésentère (Photo 4).

Les organes parenchymateux sont de dimensions normales, le foie apparaît infiltré, coloré brun-orange. Les reins présentent également parfois des infiltrations graisseuses. Les dépôts de graisse, pèsent 25—40% du poids total du corps (30 déterminations).

11. *Recherches histologiques.* L'étude des organes parenchymateux, cerveau et glandes endocrines, a été effectuée par fixation en Bouin ou formol 10%, inclusion en paraffine et coloration à l'hématoxyline — éosine ou trichrome (Azan) et celle des graisses sur coupes par congélation et coloration au Soudan III-hématoxyline. Le cerveau a été fixé en alcool absolu, inclus en celloïdine et coloré au Nissl.

*Glandes endocrines*: *Thyroïde.* Dans la grande majorité des cas on remarque une prédominance des macrofollicules à épithélium cubique aplati (6 μ) parfois endothéliforme, à colloïde homogène fortement coloré (aspect de colloïde de stase). Dans le lumen folliculaire, on observe des cellules desquamées. Ces aspects présentent différents degrés d'intensité, pouvant arriver jusqu'au goître colloïdal (Photo 5) à très grands follicules, avec épithélium disloqué et intercommunications, chargés de colloïde homogène et éosinophile. De l'épithélium folliculaire naissent de nombreuses proliférations papillifères, de véritables villo-

sités intrakystiques, formées de cellules cylindriques hautes, disposées par 2—3 rangées autour d'un axe conjonctif.

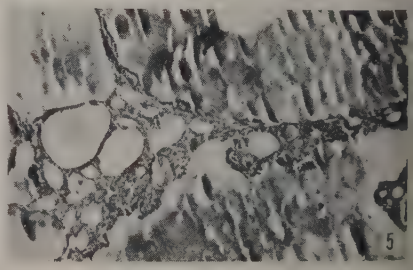
En plus, on observe de fréquentes modifications de la glande, de type *distrophique-dégénératif*, avec lésions cellulaires, cytolyse avancée, vacuolisation, hypochromie et intumescence trouble. Les modifications nucléaires se caractérisent par pycnose, karyolyse. Le colloïde est pâle, atrophique. Dans les interstices on observe une prolifération cellulaire, prenant un caractère infiltratif. Ce type de lésions ressemble à celles décrites dans la pathologie humaine comme thyroïdose. On observe de fréquentes vasodilatations et hémorragies.

*Photographie* 4. Régions de dépôts internes de graisse: ligaments larges et mésentère

*Gonades*. Ovaire: fréquentes atrophies des follicules ovariens (parfois follicules atrésiques) avec très rare apparition de corps jaunes (fig. 6). Les follicules sont petits, à structure désorganisée. Parfois apparition de microkystes ovariens. Dans la majorité des cas, on observe une sclérose ovarienne à aspect jeune, qui entoure les follicules, les étranglant.

Testicule: on constate d'intenses modifications au niveau de la ligne séminale, les tubes séminaux sont atrophiques, à structure désorganisée, avec très rares spermatozoïdes agglutinés. En échange, hypertrophie modérée des cellules Leydig, disposées en amas, d'aspect polyédrique, chargées de lipides.

*Hypophyse*. Dans l'adénohypophyse prédominent les cellules chromophobes qui présentent des lésions de citolyse et vacuolisation. On observe, en plus, l'hyperplasie des cellules basophiles (Photo 7) et des bandes de tissu collagène (allant jusqu'à la sclérose), vasodilatation, hémorragies. Dans de rares cas, on constate aussi l'apparition de kystes hypophysaires, remplis de colloïde et des cellules éosinophiles d'aspect jeune, chargées de granulations colorées en rouge-vif. Dans *la rétrohypophyse* on n'observe pas de modifications significatives.

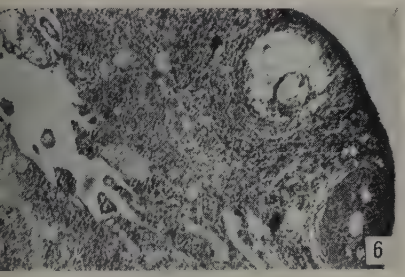



*Photographie* 5. Thyroïde — aspect de goître colloïdal H.E. × 8

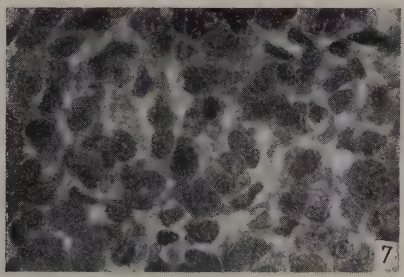
*Surrénale*: présente dans la zone réticulée les modifications les plus significatives, telles les hémorragies des capillaires et vasodilatation. On rencontre

de fréquentes cellules chargées de pigment hématique. Les lésions infiltratives sont rares.

Les zones fasciculées et glomérulaires, sont en général d'aspect normal.



*Photographie* 6. Ovaire dépourvu des corps jaunes. H.E. × 8

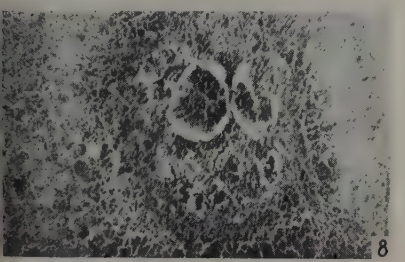


*Photographie* 7. Hypophyse — Hyperplasie des cellules basophiles, dégénérescence en chromophobes (Azan 40)

Dans la médulosurrénale on observe de fréquentes hémorragies et vasodilatations qui disloquent la structure du système chromaffin. Les cellules des endothéliums capillaires sont remplies de pigment hématique (Photo 8).

*Pancréas*: les modifications du pancréas exocrin consistent en hémorragies légères et dégranulation des cellules acineuses. Dans le pancréas endocrin, on observe une augmentation du nombre des îles, dont le volume est accru, témoignant nettement une polymacronésie. Du point de vue de la cytologie insulaire, on remarque une prédominance des cellules alpha (donc tendance à une hyperplasie du système alpha insulaire) (fig. 9—10)

*Reins*: hémorragies dans la corticale, légères lésions dégénératives tubulaires (cellules desquamées, intumescence, pycnose et karyolise avec infiltration graisseuse). Les cellules des endothéliums capillaires sont chargées de pigment hématique.



*Photographie* 8. Surrénale. Hypertrophie de la zone fasciculée, hémorragies dans la zone réticulée. Azan × 8

*Foie*: intense infiltration graisseuse des cellules hépatiques avec hémorragies et vasodilatation. Lésions infiltratives, nodulaires avec cellules rondes.

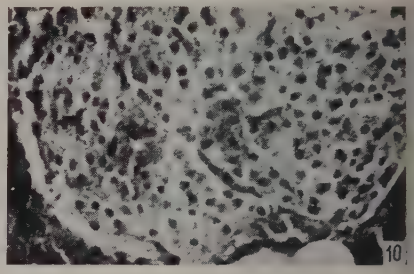
*Tissu cellulo-adipeux*: atrophique avec présence d'hémorragies. Les cellules ont des noyaux pycnotiques.

Dans le reste des organes (cœur, rate, poumons, muscles, jéjunum) pas de modifications significatives.

*Système nerveux central*: les lésions les plus intéressantes s'observent dans la région de l'hypothalamus. Dans la zone des noyaux hypothalamiques (ventromédial et paraventriculaire), on observe

des hémorragies et vaso-dilatation des capillaires. Parfois les hémorragies ont un caractère en nappe, d'autres fois un caractère de diapédèse (péricapillaires). Les neurones tendent à une neuronolyse modérée (fig. 11 et 12), avec, parfois,

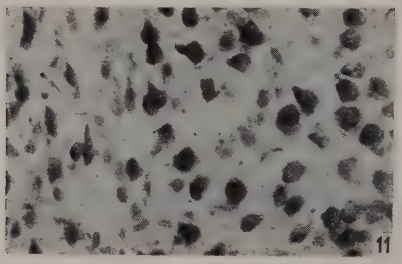
*Photographie* 9. Pancréas. Hypertrophie de l'île Langerhans. Azan × 8



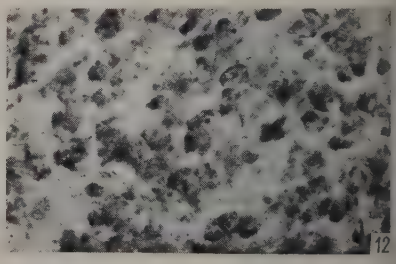
*Photographie* 10. Pancréas. Hyperplasie du système α-cellulaire et β-cellulaire Azan × 40

des aspects de neuronophagie. On remarque une prolifération discrète des cellules névrogliques.

Dans quelques cas on a observé des modifications intéressantes dans l'hypothalamus, dans une zone supérieure (du putamène) où on constate des lésions



*Photographie* 11. Cerveau. Neuronolyse et désorganisation au niveau du noyau paraventriculaire. Nissl-celloïdine × 40



*Photographie* 12. Cerveau. Neuronolyse et infiltrations dans le noyau ventromédial. Nissl-celloïdine × 40

infiltratives de type nodulaire, bien délimitées du reste du tissu nerveux. Les neurones sont tachychromatiques, avec les dendrites ratatinés.

## DISCUSSION.

Le type d'obesité apparu chez les souris se caractérise cliniquement par son apparition quasi-brusque, uniquement chez les adultes. Après une courte phase de croissance rapide de la courbe pondérale, les animaux entrent dans un stade de stabilité du poids, spécifique pour chaque individu, avec des oscilla-

ions de poids variant entre 45 et 114 g. La fréquence du syndrome dans la population reproductrice a été 1,81%.

L'obésité mène à une réduction importante de l'activité spontanée des animaux.

Du point de vue biochimique, l'hyperglycémie est constante dans la phase dynamique et stationnaire; on a trouvé des valeurs moyennes de 151 mg%. La glycémie accroît sous l'influence du somatotrope exogène et en mesure réduite par l'ACTH. L'équilibre glycémique n'est modifié par les autres hormones (adrénaline, cortisone, œstrogène). Par contre, la thyroxine, dans des expériences répétées, a déterminé une diminution évidente de l'hyperglycémie intiale, des obèses. Cette réponse paradoxale pouvait être rapportée au niveau diminué de 29—64% du glycogène hépatique, par rapport au normal.

L'insuline est active sur l'hyperglycémie des souris obèses mais elles résistent à 1—2 U insuline kg/poids vif sans troubles. Les souris „ObOb" résistent à 10 U/kg insuline poids vif.

La glycosurie des obèses atteint les valeurs de 760 mg%.

Les obèses sont constamment hypercholestérolémiques.

L'obésité étudiée par nous diffère de celles décrites par divers auteurs (7, 9, 10), qui mentionnent que chez les souris « Ob Ob» l'obésité est précoce, apparaissant chez les deux sexes, pouvant être aisément reconnue au cours de la croissance des animaux. Dans notre cas elle est tardive: chez les femelles (99,2%) elle est d'habitude en relation avec la gestation, étant donc une obésité post-gravidique, chez les mâles (0,8%) elle apparaît tardivement, au cours de la vie sexuelle.

Du point de vue biochimique, l'hyperglycémie, bien que presque constante, présente une valeur réduite, en moyenne 151 mg% (210—270 mg%, selon MAYER). La lésion principale constatée par nous est localisée au niveau du pancréas (hyperpancréatisme) et en second lieu dans la thyroïde (hypothyroïdie). En plus, l'obésité décrite par nous, diffère par l'apparition des lésions modérées de neuronolyse dans les noyaux hypothalamiques (paraventriculaire et ventromédial) indiquant probablement une lésion d'ordre métabolique de ces noyaux, très sensibles aux variations qualitatives de la glycémie.

L'hyperglycémie, toujours associée à la cholestérolémie accrue, paraît être la principale lésion biochimique, l'obésité n'étant que le symptôme clinique qui attire l'attention. A ce titre, nous avons observé l'hyperglycémie aussi chez les souris de poids normal, mais avec des processus suppurants, ce qui démontre plus clairement encore un trouble primaire dans le métabolisme des hydrocarbonates. C'est sur ce terrain que l'obésité apparaît dans les conditions d'imprégnation hormonale caractéristique à l'activité sexuelle. La graisse qui représente 35—40% du poids vif est normale du point de vue physico-chimique. Du point de vue électrophorétique les lipides sanguins des obèses sont associés à la fraction des albumines: chez les témoins ils sont conjugués avec la fraction β-globulinique.

La coexistence de l'hyperglycémie, en tant que facteur primaire, avec l'obésité, démontre que le mécanisme de glyco-réglage paraît initialement troublé. MAYER, se référant au type d'obésité « Ob Ob », considère que l'hyperglycémie est due à une hyperactivité du système α cellulaire glucagonogène, ainsi que du β- cellulaire (insulinogène). Le mécanisme intime endogène est déterminé héréditairement. Les lésions endocrines sont dues à une prédisposition structurelle parti-

culière, les troubles enzymatiques étant secondaires. Les recherches génétiques effectuées par nous par la méthode des couples frère-sœur des descendants d'une obèse, pendant plusieurs générations, sont restées négatives. Malgré cet insuccès, les données épidémiologiques suggèrent l'intervention d'un facteur héréditaire. Il semble donc, que la constitution de la souche H prédispose à l'obésité, indépendamment de l'alimentation.

Les souris étudiées par MAYER présentaient comme trouble clinique un dérèglement du mécanisme de la satiété, étant hyperphages, sans périodes de satiété dans leur comportement alimentaire. Chez nos obèses ce comportement n'a pas été observé. Selon MAYER, l'excès de glucagon produit un blocage de l'hexokinase, empêchant l'utilisation du glucose au niveau tissulaire.

Il est probable que ce mécanisme doit être tenu responsable des lésions observées par nous au niveau des noyaux hypothalamiques, vu que ceux-ci ont un caractère dégénératif et que les passages en série d'émulsion du cerveau ont été négatifs, éliminant l'idée de l'action d'un agent transmissible à ce niveau. L'obésité apparaît consécutivement au déréglement du métabolisme des hydrocarbonates, l'excès de graisse provenant plutôt des glucides que du blocage partiel de l'oxydation de l'acétate, ainsi que le soutiennent GUGGENHEIM et MAYER (4). Leurs expériences, effectuées avec de l'acétate marqué avec $C^{14}$ ont démontré un blocage partiel de l'oxydation des fragments de $C_2$, menant d'un coté, à une lipogénèse accrue, et d'un autre, à une lipolyse réduite. Selon ces auteurs, ce blocage partiel représenterait la lésion génétique primaire.

A remarquer que chez la majorité de nos animaux, l'obésité s'installe brusquement, après 2–4 grossesses. Nous avons prouvé biochimiquement qu'elle apparaît sur le fond d'un diabète sous-clinique et que cette apparition est favorisée par les conditions hormonales et métaboliques, créées dans l'organisme à la suite des grossesses. Cliniquement, les obèses sont stériles.

## CONCLUSIONS

1. Les souris blanches adultes, appartenant à la souche H, présentent spontanément un syndrome de diabète gras, dont la fréquence est de 1,81%. Le syndrome se manifeste brusquement et affecte surtout les femelles (99.2%) dans le stade post-gravidique de la vie sexuelle.

2. L'obésité a souvent un caractère monstrueux, les individus pesant de 45 à 114 g. Les dépôts adipeux représentent 25—40% du poids; la graisse est de constitution physico-chimique normale.

3. Du point de vue biochimique, l'hyperglycémie et l'hypercholestérolémie sont constantes. La glycémie augmente sous l'action du somatotrope et de l'ACTH et par contre diminue sous l'influence de la thyroxine et de l'insuline. Les obèses supportent, sans présenter de troubles 1—2 U /insuline par kg /corps.

4. Les lésions hyperplasiques et l'hypertrophie du pancréas insulaire sont les plus évidentes; on remarque également: des modifications dystrophiques de la thyroïde, l'hyperplasie des cellules basophiles hypophysaires et de même des signes modérés mais constants de lyse des neurones du noyau ventromédial et paraventriculaire de l'hypothalamus.

Les expériences et observations ont infirmé, jusqu'à présent, l'éventualité d'une origine héréditaire ou alimentaire du syndrome.

6. Le facteur déterminant est endogène, caractérisé par les troubles métaboliques liés à la suractivité globale du pancréas endocrin et de l'hypothyroïdie, de l'insuffisance surrénale et gonadique. Il semble que la souche H de souris blanche est prédisposée par sa constitution à cet ensemble de troubles, qui se développent pendant la vie sexuelle et surtout à la suite des gestations répétées. Selon nous, l'obésité est de type métabolique d'origine endocrine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bielschowsky M. et Bielschowsky F. — Austral. J. Exp. Biol. a Med., 1956, **34,** 181.
2. Decourt J. — Algérie Médicale, 1955, **59,** 483.
3. Fertmann M. B. — Arch. Int. Med., 1955, **95,** 794.
4. Guggenheim K. et Mayer J. — J. Biol. Chem., 1952, **198,** 259.
5. Ingalls A. M., Dickie M. M. et Snell G. D. — J. Hered., 1950, **41,** 317.
6. Jacobs B. B. — Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1958, **97,** 115.
7. Leites M. — Sov. Med., 1956, **20**/9.38.
8. Marschall N. B., Barnett R. J. et Mayer J. — Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1955, **90,** 240.
9. Mayer J. — Nutr. Abstr. a Rev. 1955, **25,** 597, 871.
10. Mayer J. et Marshall U. B. — Nature 1956, **178,** 1399.
11. Shull K. F., Mayer J. et Silides D. I. — Endocrinology, 1956, **58,** 1.
12. Shull K. F., Mayer J. et Silides D. I. — Endocrinology, 1956, **58,** 220.
13. Wykes A. A., Christian J. E. et Andrews F. N. — Endocrinology, 1958, **62,** 535.

## ОЖИРЕНИЕ, СОПРОВОЖДАЕМОЕ ДИАБЕТОМ В КОЛОНИИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В производственном питомнике белых мышей отмечен синдром ожирения у мышей из штамма X. Условия среды, питания и ухода были одинаковы с другими четырмя штаммами мышей у которых в тот же период наблюдения этот синдром не появился.

Частота ожирений у постоянного поголовья племенных животных штамма X составляла 1,81%.

Случаи ожирения наблюдались в 99,2% у самок. Синдром появлялся с опозданием, после 2—3 беременностей. Средний вес ожиревшеих был 68 г. (с колебаниями между 45—114г)

Ожирение сопровождалось гиперглицемией (средняя величина 151 мг%) и постоянной гликозурией. Гиперглицемия наблюдалась и у части взрослых мышей, казавшихся нормальными Это свидетельствдет о том, что нарушение биохимического равновесия углеводного обмена предшествует ожирению. Избыток жира составляет 24—40% веса тела. Внешне избыток откладывается в подкожной соединительной ткани в областях: латылочной, плечевой, ягодичной и бедренной, а внутри в широких связках, под брюшиной, в брыжейке и вокруг внутренностей. Биохимические свойства жира являются нормальными. Ожиревшие животные проявляют гиперхолестеринемю (157 мг%). Запасы гликогена в печени очень понижены у ожиревших.

Глицемия ожиревших находится под влиянием соматотропного гормона и кортикотропина, которые ее увеличивают и под влиянием тироксина, вызывающего ее снижение. Кортизон, адреналин, гексестрол не оказывают влияния на глицемию. Инсулин вызывает падение глицемии, но ожиревшие выносят без конвульсий 1—2Е. инсулина на кг/живого веса.

Ожиревшие гипотироидны (основной обмен веществ понижен), а деятельность надпочечников сильно понижена (на основания теста эозинопении Торна).

Воспроизводительная функция клинически прекращается, хотя на основании влагалищной цитограммы 15% самок проявляют нормальный цикл.

Ожиревшие имеют на много пониженную произвольную и рефлекторную деятельность. Они не выносят холода (8°C) больше чем 5—8 часов.

Что касается повреждений, больше всего изменяются щитовидная железа (изменения дистрофического дегенеративного характера) и поджелудочная железа (гиперплазия и гипертрофия лангергансовских островков). В гипофизе отмечена гипертрофия базо-

фильных клеток, в центральной нервной системе отмечаются признаки умеренного невролиза в nucleus paraventicularis и nucleus ventromedialis ядра гипоталамуса. В других эндокринных и паренхиматозных органах отмечены многочисленные неспецифические поражения.

Применяя тесное кровосмешение брат-сестра, как метод исследования возможного наследственного детерминизма синдрома, у потомков ожиревшей матери, прослеженных во все время их жизни, не удалось подтвердить наследственное происхождение синдрома.

Спонтанное ожирение появляется внезапно, точно также как и экспериментальное гипоталамическое ожирение. Гиперфагию не удалось наблюдать.

Производит впечатление, что наклонность к ожирению штамма X имеет конституциональный характер, также как наклонность к хроническим инфекциям или к сокращению продолжительности жизни, наблюдаемая в отличии от других штаммов мышей. Связь синдрома с повторными беременностями выступает в качестве фактора, определяющего течение.

Первоначальным патогенным фактором казалось является поражение островков поджелудочной железы с повышенной активностью обеих функциональных систем, вызывающей повышение количества инсулина и гликогена в крови, с гиперглицемией, устойчивостью к инсулину и отложением жира. Поражение щитовидной железы как и менее выраженное поражение гипоталамических ядер, чувствительных к отсутствию усваиваемой глюкозы производят впечатление вторичных поражений, но играющих роль в отложении жира.

По существу идет речь об эндогенном ожирении, обменного характера, с эндокринным детерминизмом, исходящим из островков поджелудочной железы, у мышей принадлежащих к штамму с конституциональным предрасположением. По характеру ее появления и течения и по отмечаемым поражениям эта форма ожирения отличается от других форм ожирения обменного типа, наблюдавшихся до сих пор у мышей.

## FETTLEIBIGKEIT IN VERBINDUNG MIT DIABETES IN EINER KOLONIE VON WEISSEN MÄUSEN


### ZUSAMMENFASSUNG

In einer industriellen Zucht von weissen Mäusen wurde das Auftreten eines Fettsuchtsyndroms bei Mäusen des Stammes H beobachtet. Die Umwelt — , Nahrungs- und Pflegebedingungen waren die gleichen wie bei anderen vier Mäusestämmen (R.A.P., Albino rosso, $C_{57}$ Bl, DBA), bei welchen das Syndrom während derselben Zeitspanne nicht auftrat.

Die Häufigkeit der Fettleibigkeit, auf den Grundstock der für die Fortpflanzung gehaltenen Tiere des H-Stammes bezogen, betrug 1,81%.

Von der Gesamtheit der Fälle von Fettleibigkeit entfielen 99,2% auf Weibchen. Das Syndrom tritt spät, nach 2—3 maliger Trächtigkeit auf. Das durchschnittliche Gewicht fettleibiger Weibchen betrug 68 g (mit Schwankungen von 45 bis 114 g).

Die Fettleibigkeit ist von einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels (Mittelwert 151 mg%), und ausnahmslos von Glykosurie begleitet. Die Erhöhung des Blutzuckerspiegels wurde auch bei einem Teil der scheinbar normalen erwachsenen Mäuse festgestellt. Das deutet darauf hin, dass die biochemische Störung des Zuckerstoffwechsels der Fettsucht vorangeht. Das überschüssige Fett macht 24—40% des Körpergewichts aus. Der Überschuss setzt sich äusserlich im subkutanen Bindegewebe der Hals-, Schulter-Gluteal und Oberschenkelgegend an und innerlich in den *Ligamenta lata*, subperitoneal, im Mesenterium und perivisceral. Das Fett weist normale chemisch-physikalische Eigenschaften auf. Die fettleibigen Tiere haben einen erhöhten Cholesteringehalt im Blut (157 mg. %). Die Glykogenreserve der Leber ist bei fettleibigen Weibchen stark herabgesetzt.

Die Glykämie fettleibiger Weibchen wird durch das somatotrope und das adrenokortikotrope Hormon gesteigert und durch Thyroxin herabgesetzt. Cortison, Adrenalin, Hexöstrol beeinflussen sie nicht. Insulin ruft einen Abfall des Blutzuckers hervor, aber fettleibige Weibchen vertragen ohne Krampferscheinungen 1—2 Insulineinheiten pro Kg. Lebendgewicht.

Die fettleibigen Weibchen sind hypothyreotisch (der Grundumsatz ist herabgesetzt) und die Tätigkeit der Nebennieren ist stark vermindert, wie sich aus dem Eosinopenietest nach Thorn ergibt. Die Fortpflanzungsfunktion hört von klinischem Standpunkt auf, obwohl auf Grund des Scheidenzytogramms 15% der Weibchen einen normalen Zyklus aufweisen.

Die fettleibigen Weibchen haben eine stark verminderte Willens-und Reflextätigkeit Sie widerstehen der Kälte (8°C) nicht länger als 5—8 Stunden.

Was die Schäden anbetrifft, sind die Schilddrüse und die Bauchspeicheldrüse die am stärksten betroffenen Organe (dystrophische und degenerative Veränderungen in der ersteren, Hypertrophie und Hyperplasie der Langerhansschen Insel in der letzteren). In der Hypophyse lässt sich eine Hyperplasie der basophilen Zellen und im Zentralnervensystem Anzeichen einer mässigen Neurolyse in den paraventrikulären und Nucleus ventromedialis des Hypothalamus fesstellen. In anderen endokrinen und parenchymatösen Organen wurden zahlreiche unspezifische Schäden beobachtet.

Durch strenge Inzucht der Abkömlinge einer fettleibigen Mutter wurde die erbliche Bedingtheit des Syndroms geprüft. Die Tiere wurden während der ganzen Lebensdauer beobachtet, aber ein erblicher Ursprung der Erkrankung konnte nicht bestätigt werden.

Die spontane Fettleibigkeit tritt plötzlich auf, ganz wie die experimentell hervorgerufene hypothalamische Fettsucht. Eine Hyperphagie konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Neigung zur Fettleibigkeit scheint beim Stamm H konstitutionell zu sein, ebenso wie die Prädisposition für chronische Infektionen und die verhältnismässig kurze Lebensdauer, welche diesen Stamm von anderen unterscheidet. Die Beziehung zur widerholten Trächtigkeit scheint der entscheidende Faktor in der Ausbildung des Syndroms zu sein.

Der primäre pathogenetische Faktor scheint die Schädigung der *Langerhansschen* Inseln zu sein, mit Hyperaktivität beider Funktionssysteme, welche Hyperinsulinismus und einen erhöhten Glukagonspiegel im Blut, mit erhöhtem Blutzucker, Insulinresistenz und Fettablagerung nach sich zieht. Die Schäden in der Schilddrüsse, sowie die weniger ausgeprägte Schädigung der auf den Mangel assimilierbarer Glukose empfindlichen Kerne im Hypothalamus, scheinen sekundär zu sein, spielen aber eine Rolle in der Fettablagerung.

Im wesentlichen handelt es sich um eine endogene Fettsucht metabolischer Art, die auf Grund einer innersekretorischen Störung in den *Langerhansschen* Inseln, bei Mäusen eines Stammes mit bestimmter konstitutioneller Prädisposition auftritt. Durch die Art ihres Auftretens und ihres Verlaufs, sowie durch die vorliegenden Schäden, unterscheidet sich diese Form der Fettsucht von den anderen, bisher bei Mäusen beobachteten Fettsuchtformen metabolischer Art.

## OBESITY ASSOCIATED WITH DIABETES IN A COLONY OF ALBINO MICE

### SUMMARY

In an industrial breeding station of albino mice a syndrome of obesity has been observed to occur in mice of the H strain. Four other strains of mice (R.A.P., Albino rosso, $C_{57}$ Bl, DBA) which were reared under the same environmental conditions and received the same diet and care did not display this syndrome during the same period of observation.

The incidence rate of obesity, as related to the permanent stock of breeding animals, amounted to 1,81 per cent.

In 99.2 per cent of the cases obesity occurred in females. The syndrome sets in at a late time, after 2—3 pregnancies. The mean body weight of the obese animals was of 68 g. (with a range of variation from 45 to 114 g.).

Obesity is constantly accompanied by hyperglycemia (mean figure 151 mg. per cent) and glycosuria. The existence of hyperglycemia was recorded also in some of the other apparently normal adult mice. This shows the biochemical disorder of sugar metabolism to precede obesity. The excess fat amounts to 24—40 per cent of the body weight. It is externally stored in the subcutaneous connective tissue of the neck, the scapulohumeral region, the gluteal region, and the tigh, and internally in the *ligamenta lata*, beneath the peritoneum, in the mesentery, and around the viscera. The fat has the normal physico-chemical characters. Obese animals exhibit increased cholesterol levels in the blood (157 mg. per cent). The glycogen reserve of the liver is considerably decreased in these animals.

The glycaemia of obese females is influenced by the somatotropic and corticotropic hormones, which increase it, and by thyroxine, which causes it to decrease. Cortisone, adrenaline, and hexoestrol do not influence it. Insulin determines a decrease of the glycaemia, but obese females resist 1—2 U. of insulin per kg live weight without displaying convulsions.

The obese females exhibit a condition of hypothyroidism (the basal metabolic rate is decreased) and the activity of the adrenals is greatly diminished, as demonstrated by Thorn's

eosinopenia test. The reproductive function is discontinued from the clinical point of view, although vaginal cytograms show that in 15 per cent of the females the oestral cycle follows a normal course.

The voluntary and reflex activity of obese females is greatly reduced. The animals do not resist cooling to + 8°C for more than 5—8 hours.

As regards the lesions, the organs most severely affected are the thyroid (alterations of the dystrophic degeneration type) and the pancreas (hyperplasia and hypertrophy of Langerhans islets). In the pituitary gland there is hyperplasia of the basophil cells and in the central nervous system signs of moderate neurolysis are present in the area of the paraventricular and ventromedial nuclei of the hypothalamus. Numerous nonspecific lesions were found to exist in other endocrine or parenchymatous organs.

The possibility of a hereditary determination of the syndrome was investigated by applying the method of strict inbreeding between the members of one litter of an obese mother. The animals were kept under observation during the whole life period, but no evidence for a hereditary origin of the disease could be found.

Spontaneous obesity sets in suddenly just like experimental hypothalamic obesity. The presence of hyperphagia could not be demonstrated.

The predisposition of the H strain to display obesity appears to be of a constitutional origin, similarly to the predisposition towards chronic infections and short lifetime recorded in this strain in contradistinction to other strains. The correlation of the syndrome with repeated pregnancy appears to be the determining factor in its course.

The primary pathogenic factor appears to be the alteration of the endocrine pancreas, with hyperactivity of both functional systems resulting in hyperinsulinism and hyperglucagonaemia with hyperglycaemia, resistance to insulin, and fat storage. The lesions in the thyroid as well as the slighter ones in the hypothalamic nuclei which are susceptible to the lack of assimilable glucose appear to be secondary but to play a part in the storage of fat.

In the main, we are dealing with an endogenous obesity of the metabolic type, which is determined by endocrine disorders in the pancreatic islets, in mice belonging to a constitutionally predisposed strain. By the way it sets in and by its course as well as by its lesional substratum this kind of obesity appears to differ from other metabolic types of obesity, as so far recorded in mice.

# ACTION DES TOXINES MICROBIENNES SUR LES CULTURES DE TISSUS

## II. ACTION CYTOTOXIQUE DES ENDOTOXINES GLUCIDO-LIPIDIQUES.

par

I. Mesrobeanu, M. Georgesco, T. Ieremia, Ecaterina Papazian, Domnica Drăghici et Lydia Mesrobeanu

*(Travail de la Chaire de Microbiologie de l'Institut Médico-Pharmaceutique de Bucarest et de l'Institut „Dr. I. Cantacuzino" — Service de Physiologie microbienne)*

— Manuscrit reçu le 18 janvier 1960 —

Dans un mémoire antérieur (9) nous avons exposé les résultats de nos recherches concernant l'effet cytotoxique de l'alpha-toxine staphylococcique sur des cultures de tissus d'embryons humain, ainsi que les essais de titrage de cette toxine et de l'antitoxine correspondante.

Poursuivant les recherches concernant l'action des toxines sur les cultures de tissus, nous présentons dans ce mémoire les résultats des expériences effectuées avec les endotoxines glucido-lipidiques. L'effet cytotoxique de ces toxines produites par les germes Gram-négatifs, a été étudié sur des cultures de cellules normales et tumorales. Si dans la littérature on trouve, à l'heure actuelle, un nombre relativement grand d'indications concernant l'action des exotoxines sur les cellules cultivées « in vitro », en ce qui concerne les endotoxines nous n'avons trouvé que les travaux effectués par Lasfargue et Delaunay (8) et ceux effectués par Gullotti (6), Cefalu (3), oddo (10) et D'Alessandro de Palerme (4).

Lasfargue et Delaunay ont étudié, par la technique en « goutte pendante » l'action de l'endotoxine « O » de *S. typhi* sur des explants de rate de cobaye. Ils ont constaté que, sous l'action de cette toxine, la vitalité du tissu diminue, la nécrose tissulaire s'installant finalement.

Les chercheurs de l'Institut d'Hygiène de Palerme ont également travaillé avec l'endotoxine de *S. typhi* et en plus avec celle de *Sh. flexneri*. En utilisant des cultures, d'explants embryonnaires de rate de poulet ou des cultures de leucocytes, ils ont constaté que ces toxines exercent une action antimigratoire, non-léthale, vis-à-vis des macrophages et que cette action est nulle sur les cultures provenant de tissus d'animaux immunisés activement.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Cellules tumorales HeLa.* Pour l'obtention de cultures en couches monocellulaires on a utilisé la technique de Scherrer, Syverton et Gey (12). Les cellules ont été incubées dans des éprouvettes 16/160 (concentration initiale de 200.000

cellules par tube) dans 1,5 ml de milieu nutritif. On a employé une souche HeLa adaptée au sérum de cheval. Les milieux de cultures utilisés ont été les suivants: milieu A: sol. Lépine 60%; sérum de cheval 40%; antibiotiques; pH=7,4; milieu B: sol. Hanks avec 0,5% hydrolysat de lactalbumine 80%; sérum de cheval 20%; antibiotiques; pH=7,4.

Après 4 à 5 jours d'incubation, nous avons sélectionné les tubes présentant une couche monocellulaire homogène et le milieu de culture a été remplacé par 2 ml de milieu d'entretien, auquel on a incorporé les produits expérimentés.

Les deux milieux de culture utilisés donnant des résultats similaires, on a employé de préférence la formule B.

Pour l'entretien des cultures on a utilisé les milieux suivants: — pour les cellules provenant du milieu de culture A: sol. Lépine 80%; sérum de cheval 20%; antibiotiques; pH=7,8;

— pour les cellules provenant du milieu de culture B: sol. Hanks avec 0,5% lactalbumine 90%; sérum de cheval 10%; antibiotiques; pH=7,8.

Nous avons constaté, qu'indifféremment des milieux utilisés, les cellules gardent un aspect normal pendant 7 jours environ, après l'introduction du milieu d'entretien.

*Cultures cellulaires provenant de tissus normaux.* Nous avons utilisé des cellules provenant d'embryons de poulet, d'embryons humains ($1^1/_2$—3 mois) et des testicules de singe adulte (Maccacus Rhesus). Pour obtenir des cultures en couche monocellulaire on a pratiqué la méthode de trypsinisation des tissus de Dulbecco et Vogt (5), adaptée à nos conditions de travail.

Les milieux de culture et d'entretien ont été les suivants:

a) pour les cellules d'embryon de poulet et de testicules de singe:

— milieu de culture: sol. Hanks avec 0,5% hydrolysat de lactalbumine 90%; sérum de cheval 10%; antibiotiques; pH = 7,2;

— milieu d'entretien: sol. Hanks avec 0,5% hydrolysat de lactalbumine 95%; sérum de cheval 5%; antibiotiques; pH = 7,6;

b) pour les cultures d'embryon humain:

— milieu de culture: sol. Hanks avec 0,5% hydrolysat de lactalbumine 89%; sérum de veau 10%; sol. L — glutamine 200 millimols, 1%; antibiotiques; pH= 7,2;

— milieu d'entretien: sol. Hanks avec 0,5% hydrolysat de lactalbumine 96,5%; sérum de veau 2,5%; sol. L — glutamine 200 millimols, 1%; antibiotiques; pH = 7,8.

A l'exception des cultures d'embryon de poulet, qui commencent à dégénérer après 9 à 10 jours, les autres ont présenté une évolution normale pendant plus de 15 jours, période dans laquelle on a pu les utiliser pour nos expériences.

Nous avons employé les endotoxines glucido-lipidiques suivantes: *Sh. shigae, S. paratyphi B, S. typhi murium (Aertrycke), Coli Vi, Serratia marcescens*, obtenues par la méthode de Boivin et Mesrobeanu (2).

Parallèlement, nous avons préparé les haptènes polysaccharidiques, en soumettant les antigènes glucido-lipidiques à une hydrolyse ménagée (100°) dans de l'acide acétique 2%. La substance soluble spécifique du surnageant est precipitée par de l'acétone et après lavage à l'alcool-éther, est desséchée. L'haptène polysaccharidique de l'endotoxine *coli* Vi a été préparée d'après la

technique de Boivin et Mesrobeanu (2) et Papazian et Mesrobeanu (11).

L'étude de l'effet cytotoxique des endotoxines et des polysaccharides mentionnés, a été entreprise sur des cultures monocellulaires d'embryons humain et de poulet. L'endotoxine Shiga a été expérimentée, en plus, sur des cultures cellulaires provenant des testicules de singe et sur des cultures de cellules tumorales HeLa.

Toutes les cultures de cellules ont été sélectionnées du point de vue aspect normal, uniformité de la couche monocellulaire et utilisées le 4-e ou le 5-e jour après incubation à 36,5°.

Les endotoxines et les polysaccharides correspondants ont été utilisés dans les concentrations suivantes: 1 mg, 0,5 mg, 0,1 mg et 0,01 mg, (par tube de culture) en employant 5 tubes de culture pour chaque dilution. Après l'inoculation des produits expérimentés, les tubes ont été contrôlés à 6, 12 et 24 heures d'incubation et ensuite journellement pendant 7 à 10 jours, notant les modifications survenues en comparaison avec les témoins. Le volume de la solution d'endotoxine du milieu d'entretien a été d'habitude de 10% et exceptionnellement de 20% du volume total du milieu. Pour une partie des tubes témoins on a toujours ajouté une quantité aliquote d'eau distillée.

## RÉSULTATS

Comme première observation il faut souligner, qu'exceptant les cultures d'embryons de poulet, qui sont plus sensibles, l'effet cytotoxique des endotoxines s'installe beaucoup plus lentement que celui des exotoxines, étant en général d'une intensité plus réduite et n'allant que pour les concentrations fortes à la nécrose totale et au décollement des cellules fixées sur la paroi des tubes.

I. *Effet cytotoxique des entodoxines sur les cultures HeLa.* Les cultures inoculées avec l'endotoxine *Shiga*, *S. paratyphi B* ou *Serratia marcescens* ont pu être observées 7 jours, pendant lesquels nous n'avons pas décelé de différence par comparaison aux tubes témoins. Même dans le lot avec 1 mg endotoxine par tube de culture, les cellules n'ont présenté aucun signe de dégénérescence, bien que cette quantité représente environ 10 $DLM_{100}$ pour les souris de 18 g.

Ces expériences, répétées plusieurs fois avec les mêmes résultats négatifs, nous ont permis de conclure que les cellules tumorales HeLa ne sont pas sensibles aux endotoxines testées.

II. *Effet cytotoxique des endotoxines sur les cultures d'embryon humain.* Les 4 premiers jours après l'inoculation de l'endotoxine, les cultures gardent leur aspect normal. C'est seulement le 5-e jour qu'on observe des modifications discrètes dans les tubes des cultures contenant 1 mg, l'effet s'accentue le 6-e jour, quand les lots avec 0,5 mg commencent également à présenter des signes de dégénérescence. L'effet cytotoxique devient de plus en plus intense, par comparaison aux témoins, présentant un maximum le 7—8-e jour. Les tubes de culture ayant reçu 0,1 mg (environ 1 $DLM_{100}$ souris de 18 g) n'ont présenté que vers le 6—7-e jour un commencement d'effet cytotoxique modéré se manifestant surtout aux cellules marginales de la culture.

L'aspect des lésions cellulaires a été analysé tant sur les cultures vivantes que sur les cultures fixées et colorées.

A l'examen direct, les cultures cellulaires ayant été en contact avec 1 et 0,5 mg endotoxine, ont présenté tout d'abord une légère tendance à l'épaississement de la membrane, les cellules devenant plus réfringentes, tandis que d'autres s'allongent, laissant apparaître des espaces libres entre elles. On constate que les cellules marginales surtout ont une tendance soit à s'élargir, soit à s'arrondir (photo 2). Le 7-e et le 8-e jour après l'inoculation de l'endotoxine, ce sont les cellules sphériques qui prédominent à la périphérie de la culture; de même, les cellules qui sont à l'intérieur de la couche monocellulaire présentent des modifications très nettes par comparaison aux tubes témoins, qui ont gardé l'aspect fibroblastique caractéristique. L'effet cytotoxique se manifeste, dans ce cas, par l'élargissement des cellules — par leur arrondissement. Quelques cellules, plus rares, présentent un aspect fusiforme, avec les noyaux en pycnose.

Ces aspects variés de dégénérescence pourraient être dus aux faits que les cellules provenant de l'embryon total se comportent différemment sous l'action de l'endotoxine, selon leurs origines.

A l'intérieur des cellules lésées, tant dans celles arrondies que dans celles élargies, on observe de fines granulations qui se groupent à une certaine distance autour du noyau. Rarement, on peut déceler des vacuoles dans le cytoplasme. Dans certaines zones de la culture, les cellules se détachent de la paroi. Dans les cultures ayant subi un contact avec 0,10 mg endotoxine, les effets cytotoxiques décrits plus haut sont plus discrets, mais analogues du point de vue qualitatif, c'est-à-dire qu'on observe dans ce lot des cellules arrondies, élargies, fusiformes, en nombre réduit. Les formations granulaires sont très fines.

Les cultures colorées à l'hématoxiline (photos 3 et 4), présentent un parallélisme assez net, en ce qui concerne l'aspect des lésions avec les cultures vivantes, mettant en évidence le même aspect de dégénérescence. En plus, les cultures qui ont été en contact avec les endotoxines, à la suite de la coloration à l'hématoxiline, présentent une diminution de la basophilie du cytoplasme par rapport aux témoins.

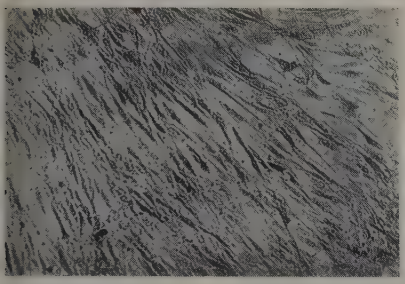
La coloration au Soudan III met en évidence une stéatose discrète par comparaison à celle observée chez les cultures de cellules d'embryon de poulet. Cette dégénérescence grasse consiste dans des granulations très fines, soudanophiles disposées autour du noyau ou de manière bipolaire; elles sont nombreuses dans les cellules hypertrophiées (photo 5).

Les modifications décrites sont identiques pour toutes les endotoxines testées. L'endotoxine de *S. paratyphi B* semble, néanmoins, plus active, plutôt par l'ampleur des lésions que par la rapidité de l'installation des modifications cellulaires.

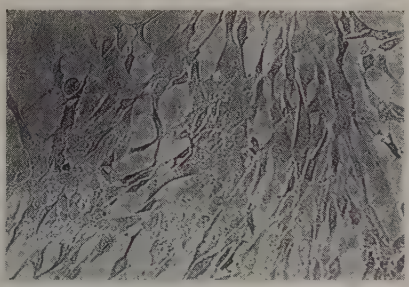
Les polysaccharides spécifiques ne provoquent que des lésions cellulaires très discrètes par comparaison aux témoins et seulement en concentrations de 1 et 0,5 mg. Ces changements n'apparaissent que le 7-e jour et sont caractérisés par une modification de forme de la cellule, sans provoquer des nécroses et décollement de la paroi du tube.

Au cours de l'expérience, les témoins ont présenté un aspect normal, sans modifications. (photo 1).

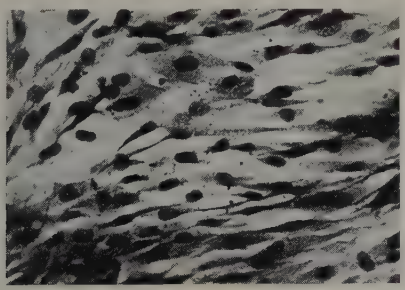
III. *L'effet cytotoxique des endotoxines sur les cultures de cellules d'embryon de poulet.* En comparaison avec les cultures de cellules d'embryon humain, les cultures provenant d'embryon de poulet sont beaucoup plus sensibles aux endotoxines microbiennes. Si dans les premières cultures, l'effet cytotoxique



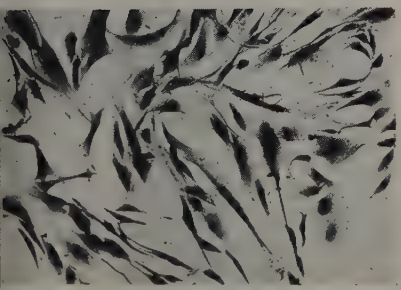
*Photographie 1.* — Culture normale de cellules d'embryon humain. Âge 12 jours. Photo. directe tube culture. Obj. 8, Oc. 10



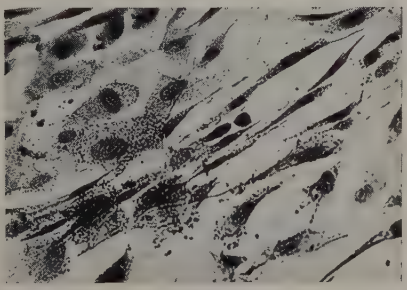
*Photographie 2.* — Culture de cellules d'embryon humain après 6 jours de contact avec 0,5 mg endotoxine glucidolipidique Shiga. Photo. directe tube culture. Obj. 8; Oc. 10



*Photographie 3.* — Culture normale de cellules d'embryon humain. Âge 12 jours. Col. Hématoxiline. Obj. 20; Oc. 10



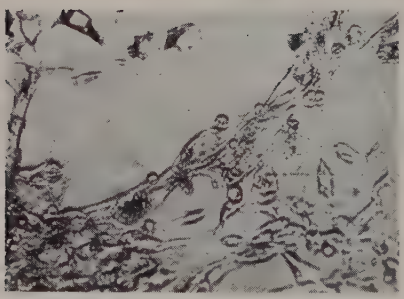
*Photographie 4.* — Culture de cellules d'embryon humain après 7 jours de contact avec 0,5 mg endotoxine glucidolipidique Shiga. Col. Hématoxiline. Obj. 20; Oc. 10



*Photographie 5.* — Culture de cellules d'embryon humain après 8 jours de contact avec 0,5 mg endotoxine glucidolipidique Shiga. Col. Soudan III. Obj. 20; Oc. 10

s'installe au bout de 5—6 jours de contact avec les endotoxines expérimentées, dans les cultures de cellules provenant des embryons de poulet, les premières modifications cellulaires apparaissent au bout de 18—24 heures, s'accentuant

*Photographie 6.* — Culture normale de cellules d'embryon de poulet. Âge 6 jours. Photo directe tube culture. Obj. 8; Oc. 10



*Photographie 7.* — Cultures de cellules d'embryon de poulet, après 24 heures de contact avec 0,5 mg endotoxine glucido-lipidique Shiga. Photo. directe tube culture. Obj. 8; Oc. 10

*Photographie 8.* — Cultures de cellules d'embryon de poulet, après 48 heures de contact avec 0,5 mg endotoxine glucido-lipidique Shiga. Photo directe tube culture. Obj. 8; Oc. 10

très rapidement en 40—48 heures, quand on constate des lésions massives et très caractéristiques. L'intensité de ces lésions, ainsi que le moment de leur apparition, dépendent de la quantité d'endotoxine employée.

Les modifications apparues se caractérisent par les étapes suivantes:

A l'observation directe on constate en premier lieu un agrandissement des cellules et une augmentation de leur réfringence. Dans le cytoplasme apparaissent des granulations qui augmentent graduellement et prennent un aspect vacuolaire; les vacuoles se développent rapidement occupant presque toute la masse cellulaire (photo 7). Au fur et à mesure de l'augmentation de la taille des granules et

des vacuoles, les cellules s'arrondissent et le processus de nécrose se termine par le décollement de la majorité des cellules fixées à la paroi du tube (photo 8).

Par coloration à l'hématoxiline et au Soudan III des cultures, on observe nettement le noyau en pycnose et les vacuoles colorées intensément par le Soudan, ce qui indique une dégénérescence grasse massive. Les tubes ont été examinés pendant 5—6 jours, les témoins ne présentant aucun effet cytotoxique. Toutes les endotoxines expérimentées engendrent des lésions identiques. Généralement, les phénomènes de dégénérescence apparaissent le plus rapidement dans les tubes contenant 0,5 et 1 mg endotoxines (après 20—24 heures). Les tubes de culture avec, 0,1 mg d'endotoxine, présentent des lésions incipientes seulement après 48 heures; après 3—4 jours, les lésions ont une intensité égale à celle provoquée par des quantités plus fortes d'endotoxine.

Les cultures ayant reçu 0,01 mg endotoxine ont donné des lésions d'intensité plus faible, qui s'installent tardivement. Sur les cultures de tissus d'embryon de poulet l'addition de l'haptène polysaccharidique donne un effet cytotoxique faible, se caractérisant par l'arrondissement des cellules marginales, phènomène qui s'installe très tardivement et seulement pour les quantités de 1 et 0,5 mg.

Au cours de l'expérience, les témoins ont présenté un aspect normal, sans modification (photo 6).

IV. *Effet cytotoxique des endotoxines sur les cultures de cellules provenant du tissu testiculaire du singe adulte.* Sur ce genre de culture nous avons expérimenté uniquement l'endotoxine Shiga. L'effet cytotoxique s'installe pour une concentration de 0,5 mg, étant en général faible avec les caractères déjà décrits pour les cultures de cellules d'embryon humain. Une seule fois, ayant à notre disposition un tissu testiculaire provenant d'un animal très jeune, nous avons obtenu des effets cytotoxiques identiques comme aspect et intensité, à ceux décrits pour les cultures provenant des tissus embryonnaires de poulet et pouvant être décelés pour des quantités de 0,1 mg endotoxine.

★

Au cours de nos recherches nous avons essayé la neutralisation de l'effet cytotoxique de l'endotoxine Shiga — sur les cultures de tissu d'embryon humain, par des antisérums de cheval et de lapin ayant des titres agglutinants élevés (1/6000) et précipitant spécifiquement l'endotoxine à des dilutions très fortes ($1:10^6$). Tous nos essais ont échoué, ce qui du reste, semble confirmer une des caractéristiques de ces endotoxines, c'est-à-dire que leurs effets biologiques ne sont pas neutralisés, ou partiellement neutralisés, par l'anticorps homologue. (voir de même Van Heyningen, 7). Néanmoins, nous poursuivons actuellement les recherches dans ce sens en utilisant les cultures de tissu d'embryon de poulet, qui sont très sensibles à l'action cytotoxique de ces produits microbiens.

## CONCLUSIONS

Dans nos recherches nous avons étudié l'action des endotoxines glucido-lipidiques de certains germes Gram-négatifs sur des cultures de tissu en couche monocellulaire. A cette fin nous avons utilisé des tissus embryonnaires de poulet et d'homme, des tissus testiculaires de singe adulte et des cellules tumorales HeLa.

L'effet cytotoxique des endotoxines a été constaté seulement sur les cultures provenant des tissus embryonnaires, n'ayant pu être mis en évidence dans nos conditions de travail, sur des cultures HeLa.

L'intensité de l'effet cytotoxique varie en fonction de la sensibilité du tissu et de la quantité d'endotoxine utilisée. La dose minimum cytotoxique pour les tissus embryonnaires expérimentés se situe entre 0,01 et 0,1 mg endotoxine par tube de culture.

Les caractères des lésions engendrées par les endotoxines, ainsi que l'intensité de l'effet cytotoxique, sont identiques pour toutes les endotoxines, inclusivement l'endotoxine *coli Vi*, sur un même tissu. A remarquer, que de toutes les endotoxines utilisées, seule l'endotoxine *S. paratyphi B* a présenté en dose minimale de 0,01 mg, un effet cytotoxique sur les cultures embryonnaires.

Les polysaccharides spécifiques préparés à partir des endotoxines expérimentées ont donné un faible effet cytotoxique — léger arrondissement des cellules marginales — qui devient visible tardivement et à une ampleur très réduite (seulement pour les doses de 1 et 0,5 mg).

De tous les tissus testés, le tissu d'embryon de poulet donne les cultures les plus sensibles aux endotoxines. Les lésions sur cette espèce de cellules apparaissent approximativement après 20 heures de contact, avec évolution rapide vers la nécrose cellulaire et le décollement de la paroi du tube, se caractérisant par: hypertrophie cellulaire, apparition de nombreux granules et apparition dans le cytoplasme des vacuoles qui prennent rapidement de grandes dimensions. La coloration des cultures par le Soudan III indique un processus de dégénérescence grasse.

Le tissu embryonnaire humain est moins sensible que celui d'embryon de poulet, les lésions caractéristiques apparaissant au bout de 5—6 jours. Les lésions cellulaires, dues à l'effet cytotoxique des endotoxines se caractérisent, dans ce cas, au début par l'hypertrophie cellulaire avec apparition simultanée des cellules en pycnose. Les signes de dégénérescence sont marqués par l'apparition des granulations et des vacuoles soudanophiles. Dans les cellules embryonnaires humaines, les vacuoles sont en nombre plus réduit et de dimensions plus petites que dans les cellules d'embryons de poulet. De même, pour cette catégorie de cellules, la nécrose cellulaire avec décollement de la paroi du tube de culture est partielle.

BIBLIOGRAPHIE

1. Boivin A. et Mesrobeanu L. — C.R. Soc. Biol., 1933, **113**, 490.
2. Boivin A. et Mesrobeanu L. — C.R. Soc. Biol., 1938, **128**, 5 et 9.
3. Cefalu M. — Boll. Ist. Sier. Milan., 1951, **31**, 259 et 412.
4. D'Alessandro G. — Riv. Ist. Sieroter. It., 1957, **32**, 157.
5. Dulbecco R.D. et Vogt M. — J. exp. Med., 1954. **99**, 187.
6. Gullotti A. — Riv. Ist. Sieroter. It., 1957, **32**, 172.
7. Van Heyningen W.E.-Schweiz. Zeit. All. Path. u. Bakt. 1955, **18**, 1018.
8. Lasfargue E. et Delaunay A. — Ann. Inst. Pasteur, 1946, **72**, 38.
9. Mesrobeanu I., Georgesco M., Ieremia T., Mitrică N. et Drăghici D. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 161.
10. Oddo F. — Boll. Soc. It. Biol., Sper., 1946, **22**, 592 et 1947, **23**, 881.
11. Papazian E. et Mesrobeanu L. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 255.
12. Scherrer W.F., Syverton J.T. et Gey G.O. — J. exp. Med., 1953, **97**, 695.

## ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙНЫХ ТОКСИНОВ В ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУРАХ

### II. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛЮЦИДО ЛИПИДНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ.


#### КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В настоящей работе изучали цитопатогенное действие, вызванное глюцидо-липидными эндотоксинами грам-отрицательных микробов, полученными по методике Буавена-Месробяну, также как и действие соответствующих полисахаридов, в разных типах нормальных или опухолевых тканей.

Установлено, что клетки опухолевого происхождения (Гела) устойчивы к данным препаратам.

Клеточные культуры нормальных эмбриональных или взрослых тканей чувствительны к экспериментальным эндотоксинам. Их чувствительность зависит от количества эндотоксина в пробирке и от происхождения ткани, но не от природы токсина.

Минимальная цитотоксическая доза колеблется между 0,01 мг — 0,1 мг для одной пробирки, в зависимости от ткани. Эмбриональная ткань курицы является наиболее чувствительной тканью. Человеческая эмбриональная ткань менее чувствительна, но постоянно реагирует в присутствии токсина.

Тестикулярная ткань обезьяны проявляет изменчивую чувствительность, зависящую повидимому от возраста животного, от которого происходит ткань.

Изменения, вызванные данными токсинами, менее выражены чем изменения, вызываемые экзотоксинами; первые появляются раньше и редко доходят до некроза. Они состоят из гипертрофии клетки и появления в цитоплазме вакуолей, обнаруживающих при окраске Суданом III жировое перерождение.

Испытанные полисахариды обуславливают более слабый цитопатогенный эффект, причем только при применении больших количеств, и в более поздних сроках.


## DIE WIRKUNG BAKTERIELLER TOXINE AUF GEWEBEKULTUREN

### II. DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG DER GLUZIDOLIPIDISCHEN ENDOTOXINE


#### ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die zytopathogene Wirkung untersucht, die von den nach dem Verfahren von Boivin und Mesrobeanu aus einigen Gram-negativen Bakterienarten extrahierten Endotoxinen, sowie von den entsprechenden Polysacchariden, auf verschiedene Typen von Kulturen normaler und tumoraler Gewebe ausgeübt wird.

Zellenkulturen von normalen embryonären oder reifen Geweben sind gegenüber der Wirkung der untersuchten Endotoxine empfindlich. Ihre Empfindlichkeit schwankt in Abhängigkeit von der pro Röhrchen eingebrachten Toxinmenge und von der Art des Gewebes, nicht aber von der Art des Toxins.

Die zytotoxische Minimaldosis schwankt, je nach dem Gewebe, zwischen 0,01 mg und 0,1 mg pro Röhrchen. Am empfindlichsten ist Hühnerembryonärgewebe. Menschliches Embryonärgewebe ist weniger empfindlich, doch reagiert es regelmässig in der Gegenwart von Endotoxin.

Affenhodengewebe weist eine schwankende Empfindlichkeit auf, die vom Alter des Tieres, von dem das Gewebe stammt, abzuhängen scheint.

Die von diesen Toxinen hervorgerufenen Schäden sind weniger stark ausgeprägt als die von Exotoxinen verursachten. Sie treten später auf und führen nur selten zur Nekrose. Gekennzeichnet sind sie durch eine Hypertrophie der Zellen und das Erscheinen von Vakuolen im Zytoplasma, deren Färbung mit Sudan III eine fettige Degeneration erkennen lässt.

Die untersuchten Polysaccharide üben eine viel schwächere zytopathogene Wirkung aus, die später eintritt und zu deren Hervorrufung grössere Mengen notwendig sind.

## THE ACTION OF MICROBIAL TOXINS ON TISSUE CULTURES

### II. CYTOTOXIC ACTION OF GLUCIDOLIPIDIC ENDOTOXINS

SUMMARY

The present work is concerned with the action exerted on various types of normal or embryonic tissue culture by the glucidolipidic endotoxins and polysaccharides extracted according to the method of Boivin and Mesrobeanu from some Gram-negative germs.

Cells of tumoral origin (HeLa) were found to be resistant to these products.

The cultures of cells from embryonic or adult normal tissues are susceptible to the endotoxins tested. Their degree of susceptibility varies in relation to the amount of toxin applied per tube and to the nature of the tissue. It does not bear any relation to the nature of the toxin.

The minimal cytotoxic dosis ranges from 0,01 mg to 0,1 mg per tube, in relation to the type of tissue. Embryonic chicken tissue is the most susceptible. Human embryonic tissue is less susceptible; however, it regularly reacts in the presence of toxin.

Monkey testicle tissue exhibits variable degrees of susceptibility which appear to be related to the age of the animal from which the tissue has been collected.

The lesions engendered by these toxins are less intense than those caused by exotoxins. They appear more slowly and rarely result in necrosis. They are characterized by hypertrophy of the cells and the appearance within the cytoplasm of vacuoles which are shown by staining with Sudan III to be due to fatty degeneration.

The polysaccharides tested exerted a much weaker cyto-pathogenic action. Greater amounts were required and the effect was delayed.

# ARIATION DU MÉTABOLISME MICROBIEN, EN FONCTION DE LA PEPTONE UTILISÉE DANS LE MILIEU DE CULTURE.

## L'ACTIVITÉ RESPIRATOIRE, LA CATALASE ET LES DÉHYDROGÉNASES DES VARIANTES « S » ET « R » DE *TYPHI MURIUM*.

par

LYDIA MESROBEANU et G. TEODORESCO

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Physiologie microbienne)*

— Manuscrit reçu le 23 mars 1960 —

Dans le cadre de nos recherches concernant la standardisation des milieux culture, nous avons entrepris une série d'expériences, en vue de déterminer s variations du métabolisme microbien en relation avec la peptone utilisée à préparation de ees milieux.

Dans ce but, nous avons étudié la variation de la consommation de l'oxygène, ctivité catalasique et déhydrogénasique des variantes « S » et « R » de la souche *yphi murium*, cultivées sur des milieux contenant des peptones différentes par rigine et mode de préparation.

Récemment, KNOTHE et coll. (1957) ont étudié l'influence des diverses ptones commerciales sur la multiplication microbienne, utilisant comme test ntensité de la respiration. A cette fin, les peptones sont ajoutées dans les réci- ents Warburg, qui renferment des suspensions de même concentration en rmes, provenant de cultures incubées pendant 3 heures. L'auteur compare nalement, l'intensité de la respiration des microbes (b. typhi) cultivés sur des ilieux qui diffèrent par la peptone utilisée, en déduisant qu'une intensité accrue nstitue l'indice d'une multiplication plus active.

Dans nos expériences, les variantes des germes « S » et « R » de *Typhi murium*, nt été cultivées sur des milieux ne différant que par la nature des peptones nployées. Les germes âgés de 18 heures, lavés par centrifugation et finalement spendus dans de l'eau distillée, sont utilisés (en concentration connue) pour détermination de leurs activités respiratoire, catalasique et déhydrogénasique.

La souche initiale de *Typhi murium*, forme « S », a servi à l'obtention d'une variante R », par macération de la culture en bouillon Martin à 37°, pendant 10 jours. Après cet tervalle, on obtient, en faisant des dispersions, une variante « R » se caractérisant par des lonies très grandes, à aspect rugueux et à marges irrégulières. Cette variante était agglu- ée en masse par la trypaflavine, en concentration de 1/500, dans une solution physiolo- que de ClNa. Les cultures en bouillon ordinaire restent limpides, les germes se déposant r le fond du tube. La souche « R » est dépourvue d'endotoxine glucido-lipidique, alors que variante « S » contient environ 7% du poids sec des germes. La variante « S » donnait, r dispersion, des colonies rondes et translucides; les germes en suspension aqueuse n'étaient

pas agglutinés par la trypaflavine, les cultures en bouillon ordinaire restant uniformément troubles, sans sédimentation des germes. Les deux variantes ont été conservées sur un milieu solide, préparé avec la peptone Merck.

Les souches « S » et « R » sont ensemencées dans du bouillon-peptone Merck et les cultures de 24 heures doivent servir à l'ensemencement des milieux renfermant une des trois peptones suivantes:

— peptone Martin provenant de l'autolyse de l'estomac de porc;
— peptone préparée par hydrolyse acide de fibrine (Marx, 1957);
— peptone commerciale de Merck.

Les deux premières peptones ont été préparées dans notre service.

Les milieux de culture sont préparés avec une des trois peptones dissoutes à raison de 10‰ dans une solution à 50‰ de ClNa. Le contenu en azote aminique de ces milieux, déterminé par la méthode de Sörensen, a donné les résultats suivants: le milieu à base de peptone-fibrine contenait 80—85 mg% N aminique, celui à base de peptone Martin, 120—125 mg % et celui à base de peptone Merck, 30 mg%.

### 1. MÉTABOLISME RESPIRATOIRE

Nos recherches se sont orientées, en premier lieu, vers l'étude du métabolisme respiratoire, étant donné que les enzymes qui participent à ce processus sont très sensibles aux moindres modifications du milieu ambiant.

En ce qui concerne les différences existant entre les variantes « S » et « R » du point de vue intensité de la respiration, on trouve cités dans la littérature, des faits qui démontrent que les variantes « R » des germes présentent, en général, un métabolisme respiratoire plus intense que celui des variantes « S ». Par le fait que les variantes « R » des germes Gram-négatifs sont dépourvues d'endotoxine, qu'elles possèdent généralement une capacité pathogène plus réduite, et une respiration très intense, leur métabolisme semble se rapprocher de celui des germes saprophytes.

Candelli et Tarozzi (1955) ont démontré que les formes « R » des trois variantes « R » des colibacilles manifestent, en présence du glucose, un métabolisme respiratoire nettement supérieur à celui des variantes « S ».

Nous avons enregistré l'intensité de la respiration des variantes « S » et « R » de *Typhi murium*, avec l'appareil de Warburg, en utilisant pour chaque épreuve des concentrations équivalentes en germes (20 mg poids sec par ml) suspendus dans l'eau distillée. On introduit dans les récipients de Warburg 1 ml de suspension microbienne, additionnée de 2 ml d'$H_2O$ distillé, et dans le réservoir central 0,5 ml de solution de KOH à 10%.

Les déterminations ont été poursuivies pendant 90 minutes; la consommation totale d'oxygène est exprimée en $mm^3$ pour 1 g germes poids sec. Les résultats sont consignés dans le tableau I.

Il ressort de l'examen de ce tableau que la consommation de l'oxygène par les variantes « S » et « R » de *Typhi murium*, cultivées sur des milieux à peptones différentes, présentent, après 22 heures d'incubation, les caractéristiques suivantes:

Quelle que soit la peptone utilisée pour la préparation du milieu de culture, la variante « R » a, en général, une activité respiratoire nettement supérieure à celle de la variante « S ».

*Tableau I*

**mm³ oxygène utilisé en 90 minutes par 1 g « Typhi murium » après 22 heures d'incubation**

| Milieu | Variante | Exp. I | Exp. II | Exp. III | Exp. IV | Exp. V | Moyenne |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| peptone-fibrine » | « S » | 8.000 | 4.600 | 7.300 | 5.800 | 6.400 | 6.420 |
| | « R » | 24.000 | 12.200 | 31.500 | 11.500 | 12.600 | 18.360 |
| peptone-Martin » | « S » | 13.000 | 3.300 | 5.900 | 4.900 | 6.600 | 6.740 |
| | « R » | 9.200 | 12.400 | 10.200 | 11.200 | — | 10.800 |
| peptone-Merck » | « S » | 5.700 | 6.600 | 5.600 | 5.800 | 4.500 | 5.640 |
| | « R » | 11.100 | 9.200 | 10.800 | 13.400 | 11.200 | 11.140 |

*Tableau II*

**mm³ oxygène consommé en 90 minutes par 1 g « Typhi murium » de divers âges.**

| Milieu | Variante | Age de la culture | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 3h. | 8h. | 22h. |
| « peptone-fibrine » | « S » | 100.000 | 124.000 | 49.000 |
| | « R » | 44.000 | 34.000 | 92.000 |
| « peptone-Martin » | « S » | 54.000 | 29.000 | 15.000 |
| | « R » | 18.000 | 10.000 | 27.000 |
| « peptone-Merck » | « S » | 85.000 | 72.000 | 40.000 |
| | « R » | 37.000 | 48.000 | 81.000 |

Cette observation confirme et complète d'ailleurs, les observations anté-
eures d'autres auteurs.

C'est la variante « R » cultivée sur le milieu contenant de la peptone-fibrine
i présente la plus grande capacité de consommation d'oxygène. Les germes
veloppés sur les milieux à base de peptone Martin ont fourni des résultats
riant d'une récolte à l'autre.

Les résultats les plus constants ont été obtenus avec les germes cultivés
r le milieu à base de peptone Merck.

Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié, par rapport aux trois peptones, la consommation de l'oxygène, en fonction de l'âge des cultures des variantes « S » et « R » de *Typhi murium*.

L'intensité de la respiration a été déterminée, dans ces expériences, sur des suspensions de germes provenant des cultures en milieu non gélosé, dans le but d'examiner l'activité des germes du même lot, après 3, 8 et 22 heures d'incubation, la concentration des germes étant la même que dans l'expérience précédente. Les résultats de ces recherches sont présentés dans le tableau II.

Ce tableau montre que les variantes « S » des cultures incubées pendant 3 à 8 heures ont une capacité respiratoire supérieure à celle des variantes « R ». Il n'est pas de même des cultures de 22 heures, dans lesquelles l'intensité respiratoire de la forme « R » est supérieure à celle de la forme « S », fait signalé d'ailleurs dans les expériences précédentes. Nous attirons l'attention qu'après 22 heures d'incubation, les deux variantes ont une intensité respiratoire nettement inférieure à celles cultivées sur des milieux solides (tableau III).

*Tableau III*

**$mm^3$ d'oxygène utilisé en 90 minutes par 1 g de corps microbiens « Typhi murium », incubés pendant 22 heures sur milieux solides et liquides (non-gélosés)**

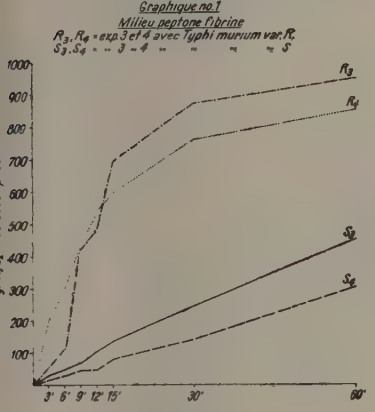
| Milieu | Variante | Milieu liquide | Milieu gélosé |
|---|---|---|---|
| « peptone-fibrine » | « S » | 49.000 | 6.420 |
| | « R » | 92.000 | 18.360 |
| « peptone-Martin » | « S » | 15.000 | 6.740 |
| | « R » | 27.000 | 10.800 |
| « peptone-Merck » | « S » | 40.000 | 5.640 |
| | « R » | 81.000 | 11.140 |

2. ACTIVITÉ CATALASIQUE.

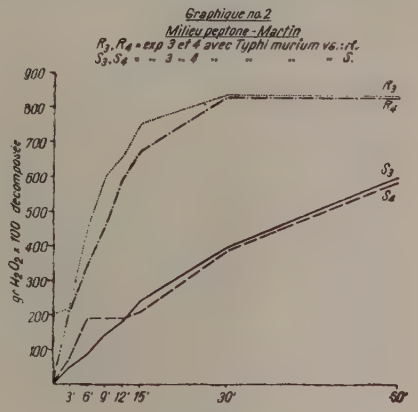
Les variantes « S » et « R » de *Typhi murium*, cultivées sur des milieux contenant une des trois peptones utilisées dans les expériences précédentes, ont été étudiées aussi du point de vue de leur activité catalasique.

Les suspensions des germes provenant des cultures de 22 heures sur des milieux solides, ont été resuspendues après centrifugation et deux lavages successifs dans l'eau distillée, à raison d'un mg de corps microbiens (poids sec) pour 1 ml de suspension. L'activité catalasique a été déterminée à l'aide de la technique de Euler et Josephson (1928). Les résultats sont exprimés en g eau oxygénée, décomposée par 1 g corps microbiens secs, à divers moments de l'expérience.

Les recherches comparatives sur les variantes « S » et « R », cultivées sur des ilieux contenant une même peptone, sont représentées dans les graphiques 2 et 3.



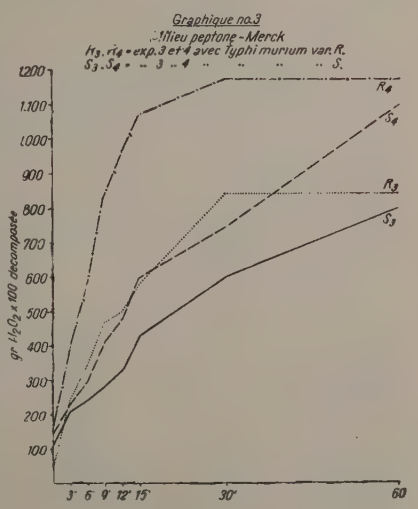

*Graphique. 1*




*Graphique. 2*

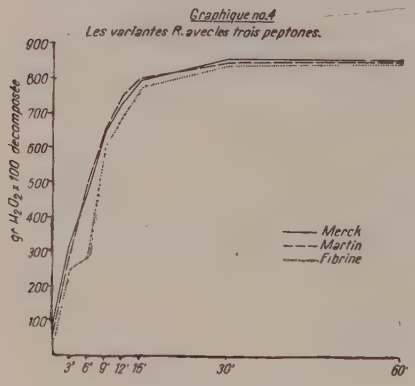
Ces graphiques montrent que l'activité catalasique des germes se comorte pareillement à leur capacité respiratoire. Les variantes «R» provenant es cultures incubées pendant 22 heures, ont une activité catalasique plus tense que les variantes « S », indépendamment de la peptone utilisée.

L'activité catalasique des variantes S » et « R » diffère non seulement du oint de vue quantitatif (les variantes R » décomposant une plus grande quanté d'eau oxygénée), mais aussi du point e vue dynamique de l'enzyme, l'activité ant caractéristique pour chacune des eux variantes. Ainsi, l'activité catalaque de la variante « R » croît rapideent, en fonction du temps, atteignant n maximum après 15—20 minutes, alors ue celle de la variante « S » augmente ntement et continuellement, pendant s 60 minutes d'observation. Ces faits ontrent que la catalase des variantes R » de *Typhi murium* a une activité de eaucoup supérieure à celle des variantes S » et que la qualité des peptones utisées dans ces expériences, ne semble as influencer les résultats. L'examen des raphiques 4 et 5 montre, en effet, que ctivité catalasique des formes « R »

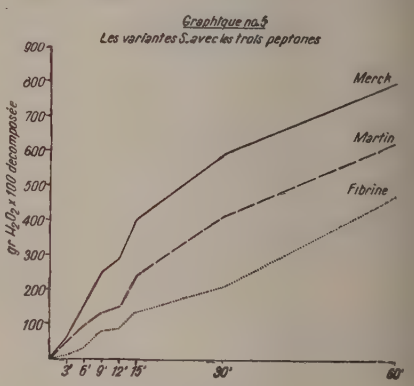



*Graphique. 3*

n'est pas influencée par la qualité des peptones qui entrent dans la composition des milieux de culture (Graphique 4). Pour les variantes « S », par contre, les courbes varient en fonction de la peptone utilisée dans le milieu de culture




*Graphique 4*




*Graphique 5*

(Graphique 5). Les germes cultivés sur le milieu à base de peptone Merck manifestent une activité catalasique supérieure à celle des germes développés sur les milieux à base de peptone Martin ou d'hydrolysat de fibrine.

L'étude de l'activité catalasique des formes « S » et « R » de *Typhi murium*, en fonction de l'âge des cultures et de la peptone a été faite sur germes développés sur les mêmes milieux non-gélosés.

L'activité catalasique a été déterminée 3, 8 et 22 heures après l'ensemencement de germes sur des prises effectuées sur une même culture. Les résultats sont exposés dans le tableau IV.

Il ressort de ce tableau, que si l'on considère l'activité catalasique des variantes « S » et « R » de *Typhi murium*, en fonction de l'âge des cultures et par rapport aux trois peptones expérimentées, on constate qu'elle se comporte pareillement à leur capacité respiratoire.

La variante « S » manifeste après 3 heures d'incubation une activité catalasique plus intense que la variante « R ». Après 22 heures d'incubation, c'est, par contre, la variante « R » qui acquiert une activité nettement supérieure à celle de la variante « S ».

Après 8 heures d'incubation, la variante « R », provenant des cultures sur milieux à base de peptone-fibrine, décompose l'eau oxygénée plus intensivement que la variante « S ». Cette différence disparaît pour les germes cultivés sur le milieu à base de peptone Merck, les germes cultivés sur milieu à base de peptone Martin donnent des résultats variant d'une expérience à l'autre.

Contrairement aux constatations faites pour la capacité respiratoire, les germes développés dans les milieux non-gélosés possèdent une activité catalasique inférieure à celle des germes développés sur les milieux gélosés, ce qui peut s'expliquer par le fait que le contact direct avec l'air stimule la production de l'enzyme. (Tableau V).

*Tableau IV*

**ariation de l'activité catalasique chez les variantes «S» et «R» de «Typhi murium» en fonction de l'âge des cultures sur milieux à base de trois peptones différentes**

| Peptone utilisée | Variante | Âge de la culture | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 3h. | 8 h. | 22 h. |
| « peptone-fibrine » | « S » | 410 | 200 | 238 |
| | « R » | 300 | 350 | 375 |
| « peptone-Martin » | « S » | 415 | 203 | 190 |
| | « R » | 310 | 225 | 280 |
| « peptone-Merck » | « S » | 390 | 220 | 225 |
| | « R » | 350 | 185 | 250 |

L'influence des trois peptones expérimentées sur l'activité catalasique des ermes est relativement la même et ne présente que des différences ne permettant as de tirer des conclusions nettes. (Tableau V).

*Tableau V*

**ctivité catalasique des variantes «S» et «R» de «Typhi murium» incubées pendant 22 heures sur milieux liquides et solides, à base de différentes peptones**

| Peptone utilisée | Variante | Milieu liquide | Milieu solide |
|---|---|---|---|
| « peptone-fibrine » | « S » | 238 | 550 |
| | « R » | 375 | 880 |
| « peptone-Martin » | « S » | 190 | 620 |
| | « R » | 280 | 1.100 |
| « peptone-Merck » | « S » | 225 | 600 |
| | « R » | 250 | 850 |

3. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DÉHYDRASIQUE.

L'activité déhydrasique des variantes « S » et « R » de *Typhi murium*, provenant des cultures sur milieux à base de trois peptones différentes, a été déterminée à l'aide de la méthode Thunberg, en utilisant comme substratum: le glucose, fructose, lactate de Na, formiate de Na et succinate de Na, en solution N/5 dans un tampon phosphate, à pH = 7,4. Pour les substratums glucose et fructose, on a utilisé également la méthode au chlorure de triphényltétrazolium, en déterminant par colorimétrie, le formasan formé sous l'action des enzymes.

Les germes incubés pendant 22 heures sont suspendus dans de l'eau distillée, à raison de 1 mg poids sec par ml. Dans chaque tube Thunberg on introduit 2 ml de la solution du substratum, 1 ml d'une solution de bleu de méthylène M/5000 et 2 ml de la suspension microbienne. Après avoir fait le vide, les tubes sont maintenus à 37°, en notant le temps nécessaire pour la décoloration du bleu de méthylène. Dans chaque expérience, on a utilisé 3 tubes Thunberg pour un même substratum. Dans le tableau VI sont exposées les valeurs moyennes de quatre déterminations effectuées dans les mêmes conditions d'expérimentation.

*Tableau VI*

**Les déhydrogénases des variantes «S» et «R» de «Typhi murium», cultivées sur milieux à base de trois peptones différentes (méthode Thunberg)**

| Substratum / Peptone | Glucose | Fructose | Lactate de sodium | Formiate de sodium | Succinate de sodium |
|---|---|---|---|---|---|
| | Moyenne | Moyenne | Moyenne | Moyenne | Moyenne |
| Fibrine « S » | 8 | 4 | 8 | $6^{40}$ | 38 |
| Fibrine « R » | 14 | 7 | 10 | 11 | 40 |
| Merck « S » | 9 | 7 | 5 | $5^{15}$ | 19 |
| Merck « R » | 17 | 7 | 8 | $6^{40}$ | 23 |
| Martin « S » | 19 | 7 | $5^{20}$ | $5^{10}$ | 23 |
| Martin « R » | 16 | 7 | $7^{40}$ | $5^{40}$ | 21 |

Les valeurs exprimées dans ce tableau représentent le temps de décoloration du bleu de méthylène, en minutes.

Il ressort de l'ensemble de ces expériences, que les résultats les plus constants sont fournis par les germes cultivés sur milieux à base de peptone-fibrine. L'activité déhydrogénasique des variantes « S », âgées de 22 heures, est supérieure à celle des variantes « R » ,quel que soit le donateur employé.

En ce qui concerne l'activité déhydrogénasique des germes cultivés sur les deux autres peptones: Merck et Martin, les résultats inconstants ne permet-

ent pas de tirer une conclusion nette. La succinate-déhydrogénase semble être a moins active des déhydrases étudiées.

Les résultats obtenus avec le chlorure de triphényltétrazolium sont comparables à ceux obtenus avec la méthode de Thunberg.

## CONCLUSIONS

L'étude de l'influence exercée par trois peptones différentes (hydrolysat acide de fibrine, peptone Martin et peptone Merck) sur la capacité respiratoire et les enzymes d'oxydo-réduction, catalase et déhydrogénase des variantes « S et « R » de *Typhi murium*, nous a permis de faire les constatations suivantes:

1. La capacité respiratoire des germes est influencée par la qualité des peptones qui entrent dans la composition du milieu de culture. Les germes développés sur le milieu, à base de peptone-fibrine, ont une capacité respiratoire nettement supérieure à celle des germes développés sur les milieux à base de peptone Merck ou Martin, cette dernière fournissant des résultats qui varient d'une expérience à l'autre (Tableau I).

L'étude de l'intensité de la respiration, en fonction de l'âge des cultures des variantes « S » et « R » de *Typhi murium* a montré, qu'après 3 à 8 heures d'incubation, l'activité de la variante « S » est supérieure à celle de la variante « R », alors qu'après 22 heures, c'est l'activité de la variante « R » qui est nettement supérieure à celle de la variante « S » (Tableau II).

2. L'étude des catalases microbiennes a révélé un comportement similaire à celui de la respiration, en ce qui concerne l'activité enzymatique et l'âge de la culture.

Quant à l'influence exercée par les trois peptones expérimentées sur l'activité catalasique des variantes « R » et « S » de la souche *Typhi murium*, nous n'avons pas constaté de différences aussi nettes, que dans l'étude de la respiration.

3. En ce qui concerne les déhydrases, seul le milieu à base d'hydrolysat de fibrine a fourni des résultats concluants. Quel que soit le donateur employé, après incubation de 22 heures des cultures, l'activité déhydrasique de la variante « S » est supérieure à celle de la variante « R ».

## BIBLIOGRAPHIE

1. Candelli H. et Tarozzi J. — Boll. Ist. Sier. Milanese, 1955, **34**, 165.
2. Euler H. et Josephson K. — Ber. Chem. Ges. 1923. **56**, 1749 (cités par Sumner et Somers — Chemistry and methods of enzymes, 1947 Ed. Acad. Press).
3. Knothe H. — Ztschrft. f. Hyg., 1957, **144**, 65.
4. Marx A. — Epidemiol., Microbiol. şi Parazitol., 1957, No 2, 460.

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОБМЕНА МИКРОБОВ В СВЯЗИ С ПЕПТОНОМ ПРИМЕНЯЕМОМ ДЛЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

### КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучение влияния трех различных пентонов (кислый гидролизат фибрина, мартеновский пептон и пептон Мерка) на дыхание и окисляюще-восстановительные энзимы-каталаза и дегидрогеназа «S» и «R» вариантов палочки мышинного типа, дало возможность установить слудующее:

1. Дыхание микробов находится под влиянием качества пентонов, входящих в состав питательной среды. Микробы, развивающиеся на среде, приготовленной с пептоном из фибрина, обладают более высокими дыхательными способностями, чем, микробы, развившиеся на средах с пептоном Мерка или Мартена, причем мартеновский пептон дает различные результаты при каждом отдельном опыте.

При изучении интенсивности дыхания в зависимости от возраста культур «S» и «R» вариантов палочки мышиного тифа установлено, что после 3—8 часов инкубации активность «S» варианта превосходит таковую R варианта, в то время как после 22 часов активность «R» варианта явно превосходит активность «S» варианта.

2. При изучении микробных каталз отмечено поведение сходное с динамикой дыхания, во что касается энзиматической деятельности и возраста культуры.

Во что касается влияния изучаемых трех пептонов на каталазную деятельность «S» и «R» вариантов штамма палочки мышинного тифа, неотмечены такие явные отличия как при изучении дыхания.

3. При изучении дегидраз, только среда с гидролизатом фибрина дала убедительные результаты. При применении какого либо донора, после инкубации культур в течении 22 часов, дегидразная деятельность «S» варианта превосходит дегидразную деятельность «R» варианта.

## VARIATIONEN DES MIKROBENSTOFFWECHSELS IN ABHÄNGIGKEIT VON DEM IM NÄHRBODEN VERWENDETEN PEPTON

ZUSAMMENFASSUNG

Aus einer Untersuchung des Einflusses, den drei verschiedene Peptonarten (Fibrin-Säurehydrolysat, Martin-Pepton und Pepton Merck) auf die Atmungsfähigkeit und die Oxydoreduktionsenzyme Katalase und Dehydrogenase der «S» und «R» Varianten von *S. typhimurium* ausüben, ergaben sich folgende Feststellungen:

1. Die Atmungsfähigkeit der Keime wird durch die Art der Peptone, die in die Zusammensetzung des Nährbodens eingehen beeinflusst. Die Keime, die sich auf einem Nährboden mit einer Fibrin-Pepton Grundlage entwickeln, besitzen eine nennenswert höhere Atmungskapazität als Keime die auf Nährböden mit Merck- oder Martin-Pepton wachsen, wobei die Ergebnisse bei letzterem von einem Versuch zum anderen verschieden sind.

Aus einer Untersuchung der Atmungsintensität, im Zusammenhang mit dem Alter der Kulturen von «S» und «R» Varianten von *S. typhimurium*, ging hervor, dass nach 3—8 Stunden Bebrütung, die Aktivität der «S» Variante höher ist als die der «R» Variante, während nach 22 Stunden die Aktivität der «R» Variante die der «S» Variante klar übertrifft.

2. Das Studium der bakteriellen Katalase, ergab, in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Alter und enzymatischer Aktivität der Kulturen, ein ähnliches Verhalten wie im Falle der Atmung.

Was den Einfluss der drei erprobten Peptonarten auf die Kataläseaktivität der «R» und «S» Varianten von *S. typhimurium* betrifft, konnten keine so ausgeprägte Unterschiede, wie bei der Atmung festgestellt werden.

3. Hinsichtlich der Dehydrase, lieferte nur der Nährboden mit Fibrinhydrolysat beweiskräftige Ergebnisse. Gleichgültig welche wasserstoffabgebende Verbindung verwendet wird, ist nach zweiundzwanzigstündiger Bebrütung der Kulturen die Dehydraseaktivität der «S» Variante der Dehydraseaktivität der «R» Variante überlegen.

## VARIATIONS OF MICROBIAL METABOLISM AS RELATED TO THE PEPTONE USED IN THE CULTURE MEDIUM

SUMMARY

A study of the influence exerted by three different kinds of peptone (acid fibrin hydrolysate, peptone Martin, and peptone Merck) on the respiration and oxidation- reduction enzymes catalase and dehydrogenase of «S» and «R» variants of *S. typhimurium* resulted in the following findings:

1. The respiratory capacity of the germs is influenced by the quality of the peptone contained in the culture medium. Germs developing on a culture medium containing fibrin-

eptone possess a definitely higher respiratory capacity than those developing on media contain-
ng Merck or Martin peptones. The results obtained with the latter type of peptone vary
rom one experiment to another.

The intensity of respiration was investigated in relation with the age of the cultures
f « S » and « R » variants of *S. typhimurium*. After 3 to 8 hours of incubation the activity
f the « S » variant exceeds that of the « R » variant, while at the end of 22 hours the activity
f the « R » variant is definitely superior to that of the « S » variant.

2. The behaviour of microbial catalases as regards enzymatic activity and age of the
ulture was similar to that of respiration.

In regard to the influence exerted by the three investigated types of peptone on the
atalase activity of « R » and « S » variants of *S. typhimurium* strains, the differences detec-
ed were not so clear-cut as in the case of respiration.

3. As regards dehydrases, the culture medium containing fibrin hydrolysate was the
nly one to yield conclusive results. Whatever the donor used, after 22 hours of incubation
he dehydrase activity of the « S » variant exeeds that of the « R » variant.

# ONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA BIOLOGIE DES *KLEBSIELLA*

## . ÉTUDE BIOLOGIQUE ET IMMUNO-CHIMIQUE DE 2 VARIANTES « S » DE *KLEBSIELLA*

par

SYLVIA EUSTATZIOU, CELLA BARBER, MARIA VOINEA et GERTRUDA TULPAN

*Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Cultures microbiennes et de Biochimie générale)*

— Manuscrit reçu le 23 mars 1960 —

Dans des recherches antérieures sur la biologie et l'immuno-chimie des lebsiella (1) à part des modifications inconstantes (colonies mucoïdes à structre radiaire K $MC_{56}$ (A) et K52144 (A) ou colonies mucoïdes à segments et arges translucides K $MC_{57}$ nous avons constaté chez les souches K52212 KP, l'apparition de colonies « S » stables (2). Dans cette note nous exposons s résultats de l'examen des caractères biologiques et le comportement sérolopque des 2 mutantes « S » 52212 ET P, en rapport avec leurs antigènes extraits ar voie chimique.

### MATÉRIEL ET MÉTHODE

Quatre souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été étudiées:
K. 52212 type V (Inst. Pasteur), GR $O_2E5052$
K. P isolé de l'urine d'un cas de piélonéphrite
52212 variante
P variante

Nous avons suivi le même plan d'étude et les mêmes méthodes, que pour étude biologique et immuno-chimique des souches d'origine (en ajoutant de ouveaux tests de métabolisme spécifiques).

On a étudié:

1. La morphologie des colonies et des germes; la présence de la capsule oloration BURRI GINS et encre de Chine-préparé frais) et la mobilité des ouches.

2. Les réactions biochimiques comprenant: fermentation des carbohydrates, · P, M · R, $H_2S$, indol, liquéfaction de la gélatine, test de l'uréase, tests des écarboxylases des aminoacides (lysine, arginine, ornithine, acide glutamique) ), utilisation des acides organiques (d-tartrate, l-tartrate, i-tartrate, citrate e sodium, mucate) (4).

3. Le test de la sensibilité des germes aux drogues (streptomycine, érythroycine, nitrofuran et sulfathiazole) par la méthode difusimétrique en surface (5).

*Tableau I*

**Composition chimique des antigènes à partir des Klebsiella capsulées et des mutantes non-capsulées**

| Extrait I (phénol 90%) | Rendements | Lipides | P | N | Glucides | Oses qui entrent dans la constitution des polysaccharides |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Klebs. E52212 capsulée: mucoprotéine | 3.70% | 0.80% | — | 10.6 % | 21% | galactose |
| » E52212 « S »: lypopolysaccharide | 1.70% | 10.00% | 1.60% | 4.70% | 50% | galactose, glucose, acides uroniques |
| » P capsulée: mucoprotéine | 1.56% | 0.80% | — | 9.90% | 22% | galactose |
| » P « S »: nucléoprotéine | 2.16% | 0 | 2.80% | 8.40% | 18% | ribose |
| Extrait II sol. ClNa 0.9% (consécutif à l'extraction par le phénol) | | | | | | |
| Klebs. E52212 capsulée: polysaccharide polymère | 23% | 1.50% | 1% | 3.60% | 64.10% | galactose, glucose, mannose, fucose, xylose, acides uroniques |
| » E52212 « S »: nucléoprotéine | 6% | — | 5.90% | 10.40% | 28% | ribose |
| Klebs. P (capsulée): polysaccharide polymère | 20% | 0.80% | 0.83% | 4.00% | 57% | galactose, glucose, mannose, fucose, xylose, acides uroniques |
| » P « S »: polysaccharide + nucléoprotéine | 5.40% | — | 1.50% | 8.10% | 35% | galactose, glucose, ribose, acides uroniques |

4. Pour le système phage-bactérie on a utilisé les phages spontanément libérés par la souche KE 52212 (capsulée).

5. La virulence sur des souris de 16—18 g qui ont été inoculées par voie péritonéale.

6. On a étudié comparativement, du point de vue chimique et immunologique, les extraits isolés des variantes ainsi que les extraits des souches mucoïdes d'origine.

L'isolement des antigènes ainsi que leur analyse ont été exécutés selon les techniques décrites antérieurement (6).

Aux mêmes méthodes d'extraction des antigènes, les variantes « S » réagissent différemment. Alors que par le phénol 90% on a extrait des bactéries capsulées, des mucoprotéines spécifiques à rendements variables, avec le même solvent, on a extrait de la mutante E 52212 un lipopolysaccharide, tandis que de la mutante P on a isolé une nucléoprotéine (v. tableau I).

Par l'extraction avec une solution ClNa 0,9% (consécutive à la séparation de l'antigène phénol-soluble) à partir des bactéries capsulées on obtient invariablement des polysaccharides polymérisés, alors que des mutantes on obtient une nucléoprotéine spécifique (52212), associée parfois au polysaccharide (cas de la mutante P). Le comportement des différentes souches vis-à-vis des mêmes solvents est caractérisé surtout par la quantité de matériel antigénique libéré, les souches d'origine capsulées laissant passer en solution 4—5 fois plus d'antigène que les mutantes non-capsulées « S ».

7. Des sérums antimicrobiens des variantes et des souches mucoïdes ont é préparés sur le lapin.

On a étudié la spécificité des antisérums obtenus, par:

*a)* la réaction capsulaire spécifique;

*b)* la réaction d'agglutination avec des germes capsulés et des variantes on-capsulées (KAUFFMANN) (7).

On a déterminé la valeur immunologique des extraits chimiques par:

*c)* le test de précipitation en anneau (Ring-test) et par

*d)* la réaction de la double diffusion en gel d'agar (OUCHTERLONY).

## RÉSULTATS

1. L'étude morphologique des cultures sur agar 2% (boîtes Petri) après s passages répétés pendant 6 à 7 mois, a montré chez la *Klebsiella mucoïde* 52212 en dehors des colonies opaques longues, coulantes (5—10 mm amètre) l'apparition de colonies beaucoup plus petites de type « S » de 1—2 mm amètre. La souche « P » présentait en plus des colonies mucoïdes rondes (3 mm diamètre) des colonies « S » à centre opaque ($1^1/_2$—2 mm de diamètre) les clichés).

À l'examen microscopique des colonies mucoïdes, les germes présentaient s capsules appréciables, alors que les variantes n'étaient pourvues que d'un lo de diffraction (DUGUID) également présenté par les souches non-mucoïdes Esch. coli examinées dans les mêmes conditions (8).

2. Les réactions biochimiques des *Klebsiella* sont exposées dans le tableau II.

Les réactions fermentatives des carbohydrates, les réactions V.P. et M.R., test de l'urée des mutantes E52212 et P, ne diffèrent pas de celles des souches origine (capsulées).

En ce qui concerne l'utilisation des acides organiques, la mutante E52212 compose le d-tartrate, tandis que la souche d'origine ne le décompose pas. ette souche est la seule des *Klebsiella* étudiées qui utilise le citrate de Na. outes les souches utilisent le mucate. Les tests des décarboxylases de la lysine de l'acide glutamique positifs pour les mutantes E 52212 et P, sont négatifs our la souche d'origine KE 52212. Le test de l'ornithine est positif seulement our la souche d'origine P; celui de l'arginine et du KCN sont positifs pour utes les souches (d'origine et mutantes).

3. Quant à la sensibilité des germes aux antibiotiques il existe des différences marquées entre la souche mucoïde KE52212, sensible aux drogues et la utante non-capsulée, totalement résistante à la streptomycine, érythromycine, trofuran et sulfathiazole. La mutante P ainsi que la souche d'origine KP, sont sistantes à la streptomycine, érythromycine, nitrofuran et sulfathiazole.

4. Sensibilité aux phages. La mutante P est sensible à plusieurs phages, nt un élibéré spontanément par la souche mucoïde KE52212 et l'autre par mutante, elle-même sensible au phage (contrairement à la souche d'origine 52212 qui n'est que lysogène). Les *Klebsiella* étudiées n'appartenant pas x types I ou II, (des conditions différentes de travail), nous n'avons pas conaté l'apparition du halo entourant la plage, signalé par ADAMS 1956 (9).

5. Les résultats des tests de virulence des mutantes 52212 et P (inscrits ns le tableau III) prouvent que la mutante 52212 est 100 fois moins virulente

*Tableau II*

**Réactions biochimiques des souches capsulées (d'origine) et des mutantes homologues de Klebsiella examinées**

| Substance | KE 52212 | E52212 (mutante) | K.P. | P.(mutante) |
|---|---|---|---|---|
| Adonitol | + | + | + | + |
| Dulcitol | − | − | − | − |
| Sorbitol | + | + | + | + |
| Arabinose | − | − | + | + |
| Maltose | + | + | + | + |
| Xylose | + | + | + | + |
| Rhamnose | + | + | + | + |
| Salycine | + | + | + | + |
| Inositol | + | + | + | + |
| Lactose | + | + | + | + |
| Saccharose | + | + | + | + |
| Mannitol | + | + | + | + |
| Glucose | + | + | + | + |
| Indol | − | − | − | − |
| $H_2S$ | − | − | − | − |
| Gélatine | − | − | − | − |
| $KNO_3$ | + | + | + | + |
| V.P. | − | − | − | − |
| M.R. | + | + | − | − |
| Urée | + | + | + | + |
| Na citrate | + | − | − | − |
| d-tartrate | − | + | + | + |
| l-tartrate | ± | − | ± | − |
| i-tartrate | − | − | − | − |
| mucate | + | + | + | + |
| Lysine | − | + | + | + |
| Arginine | + | + | + | + |
| Ornithine | − | − | + | + |
| Acide glutamique | − | + | + | + |
| KCN | + | + | + | + |

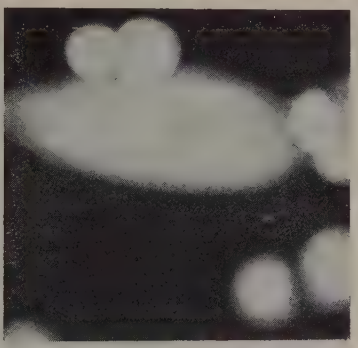
Légende:
− = négatif après 14 jours
+ = positif après 1—2 jours
± = faible positif
K = Klebsiella mucoïde-capsulée

*Tableau II*

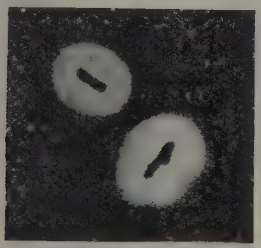
**Virulence des Klebsiella étudiées pour la souris**

| Souches | No. des germes inoculés | No. des souris inoculées | Morts | Survivants |
|---|---|---|---|---|
| KE 52212 (capsulée) | 1.250.000 | 5 | 5 | 0 |
| E 52212 (mutante) | 125.000.000 | 5 | 5 | 0 |
| K.P. (capsulée) | 750.000.000 | 5 | 0 | 5 |
| P. (mutante) | 750.000.000 | 5 | 0 | 5 |

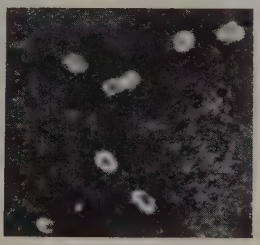
*Photographie 1.* — Culture sur agar de *Klebsiella pneumoniae* 52212 Type V (E) mucoïde + colonie « S » apparues au cours des sous-passages



*Photographie 2.* — Culture de *Klebsiella pneumoniae* 52212. Détails = colonie mucoïde + colonie « S ».



*Photographie 3.* — Germes capsulés *Klebsiella pneumoniae* 52212 (E) (mucoïde)



*Photographie 4.* — Germes « S » halo en difraction

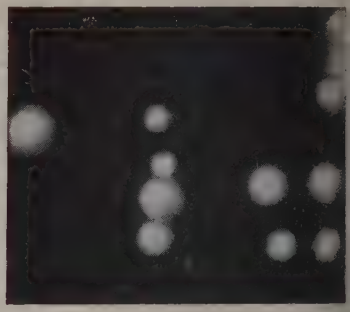
ue la souche d'origine dont la dose léthale est de 1.250.000 germes. La mutante tout comme la souche d'origine, est avirulente.

6. Pour ce qui est de la constitution du polysaccharide, isolé des mutantes vec un rendement 5 à 6 fois moindre, il est composé d'un nombre beaucoup lus restreint d'oses, sans que la spécificité sérologique en soit affectée; les acides roniques en petites quantités sont présents dans les polysaccharides des nutantes.

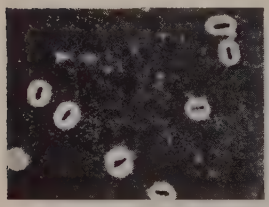
Un nouvel antigène non-signalé jusqu'à présent chez les *Klebsiella* est la bonucléoprotéine spécifique isolée des deux mutantes.

7. Les caractères sérologiques des mutantes et la valeur des extraits homogues, ainsi que celle des extraits des souches capsulées (KE 52212 et KP) sont xposés dans le tableau V.

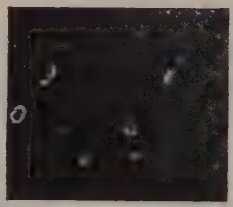
*Photographie 5.* — Culture sur agar de *Klebsiella pneumoniae* P mucoïde + colonie « S » au cours des sous-passages



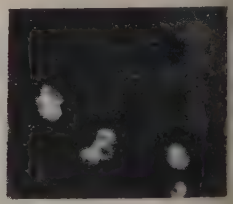
*Photographie 6.* — Culture de *Klebsiella pneumoniae* P. Détails + colonie mucoïde + colonie « S »



*Photographie 7.* — Germes capsulés *Klebsiella pneumoniae*



*Photographie 8.* — Germes « S » halo en difraction P var.



*Photographie 9.* — Germes Escherichia coli mucoïdes halo en difraction

*Tableau IV*

**L'agglutination des Klebsiella (capsulées) et des mutantes avec les sérums homologues et hétérologues**

| Antigènes | Antisérums | Dilutions | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 |
| KE 52212 (capsulée) | KÉ 52212 (caps.) | + | — | — | — | — | — | — |
| É 52212 (mutante) | KÉ 52212 (caps.) | + | + | + | + | + | + | + |
| E 52212 (mutante) | E 52212 (mutante) | + | + | + | + | + | + | + |
| KÉ 52212 (capsulée) | E 52212 (mutante) | + | — | — | — | — | — | — |
| KP (capsulée) | KP (caps.) | + | + | + | + | — | — | — |
| P (mutante) | KP (caps.) | + | + | + | + | + | + | + |
| P (mutante) | P (mutante) | + | + | + | + | + | + | + |
| KP (capsulée) | P (mutante) | + | + | + | + | — | — | — |

La spécificité des antisérums a été contrôlée par la réaction capsulaire spécifique, aussi bien pour les souches homologues que pour leurs mutantes.

*a)* Les souches d'origine capsulées ont réagi fortement (+++) en présence des antisérums homologues; la capsule devenait nettement visible par le gonflement du corps microbien (2 à 3 fois), alors que les mutantes ne donnaient qu'une réaction limitée au corps microbien qui est légèrement augmenté de volume. Les antisérums des mutantes non- capsulées testés vis-à-vis des souches homologues, aussi bien que vis-à-vis des souches hétérologues, ne provoquent qu'un léger gonflement du corps microbien.

b) Les réactions d'agglutination (tableau IV). On constate une faible agglutinabilité (1/20, 1/160) des *Klebsiella* mucoïdes capsulées, avec des sérums homologues et hétérologues, tandis que les mutantes sont agglutinées, par les sérums homologues, de même que par les anti-sérums des germes capsulés (à une dilution de 1/1280).

*c)* En ce qui concerne la spécificité des substances isolées par voie chimique, on constate par le test de précipitation en anneau (Ring-test, tableau V) que les sérums obtenus possèdent un pouvoir de combinaison marqué aussi bien pour les antigènes homologues que pour ceux des souches hétérologues. Ainsi,le polysaccharide polymérisé, isolé de la souche capsulée KE52212, précipite avec le sérum antimicrobien homologue à une dilution de 1:128.000 et avec l'anti-sérum de la mutante, à une dilution de 1:256.000, alors que le lipopolysaccharide isolé de la mutante E52212 réagit avec le sérum homologue à une dilution de 1:1.024.000 et avec le sérum de la souche capsulée à une dilution de 1:256.000 (v. tableau V), ce qui prouve la nature commune du polysaccharide spécifique, isolé soit de la souche capsulée, soit de la mutante non-capsulée, les différences étant seulement d'ordre quantitatif.

*Tableau V*

**Précipitation spécifique des antigènes isolés des Klebsiella capsulées et de leurs mutantes avec les antisérums homologues et hétérologues**

| Anti-sérums microbiens | Antigènes | Dilutions : | Mucoprotéines des souches capsulées (Extrait I) | Polysaccharides polymérisés (Extrait II) | Polysaccharides des mutantes | Ribo-nucléoprotéines des mutantes | Précipitinogène (Surnageant des cultures) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kleb. E 52212 capsulée | E 52212 | 1/8000 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | + |
| » E 52212 (mutante) | | 1/16000 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | + |
| » P (capsulée) | | 1/32000 | | ++++ | +++ | +++ | + |
| » P (mutante) | | 1/64000 | | +++ | ++ | + | + |
| | P | 1/128000 | | +++ | ++ | | + |
| | | 1/256000 | | ++ | ++ | | |
| | | 1/512000 | | + | + | | |
| | | 1/1024000 | | | + | | |

La mutante P se distingue de la souche d'origine par une faible antigénicité; le sérum obtenu avec cette souche réagit faiblement avec l'antigène homologue 1:16.000, alors que le sérum de la souche capsulée précipite ce même antigène à une dilution plus élevée (1:32.000) (tableau V).

Les tests de double diffusion en gel (OUCHTERLÓNY) donnent des résultats parallèles avec les tests de précipitation en anneau; les sérums des souches capsulées précipitent en gel, avec les antigènes homologues, ainsi qu'avec les antigènes des mutantes; les sérums des mutantes précipitent en gel aussi bien avec le polysaccharide homologue qu'avec le polysaccharide des souches capsulées. Les sérums saturés avec les polysaccharides homologues ne précipitent d'ailleurs pas avec les polysaccharides hétérologues, L'identité immunologique des polysaccharides des souches capsulées avec celle des mutantes est prouvée aussi par cette voie.

## DISCUSSION

La tendance, à la variation dans des conditions habituelles de culture et de conservation (cultures stock) caractérise la majorité des souches mucoïdes; en ce qui concerne la variabilité de la *Klebsiella* de type V (E), celle-ci a été étudiée par de nombreux auteurs. Ainsi, du travail d'EDWARDS (1952) (10) il ressort que la souche E 5052 (type V) de KAUFFMANN, ne produisait pas de capsule, mais par sélectionnement des colonies, on a isolé une variante mucoïde capsulée.

ØRSKOV (11) souligne l'antigénicité exceptionnelle d'une variante acapsulée de type V qui contraste avec l'inagglutinabilité de la souche mucoïde homologue, ce que nous confirmons à notre tour dans le présent travail.

Dans nos recherches la mutante E52212 (apparue spontanément) de forme « S », différente de la souche mucoïde d'où elle provient, est formée de germes sans capsules, résistants aux antibiotiques, sensibles au phage, présentant un comportement enzymatique propre (le test de décarboxylase de la lysine et de l'acide glutamique positif), 100 fois moins virulent, sérologiquement dépendant de la souche d'origine et plus antigénique que celle-ci.

La seconde mutante « P » de forme « S » acapsulée lysosensible, identique à la souche mucoïde P du point de vue métabolisme, sauf le test de décarboxylase de l'ornithine, est également apparenté avec la souche d'origine, du point de vue sérologique.

En ce qui concerne les réactions des germes en présence des antisérums, le fait que les germes capsulés, de même que les non-capsulés, augmentent plus ou moins de volume, lorsqu'ils sont mis en présence des antisérums homologues et hétérologues, prouve que l'augmentation du corps microbien en présence des anti-sérums est due à la quantité de substances polysaccharidiques réparties différemment, selon qu'il s'agit d'un germe mucoïde capsulé ou de sa variante « S » non-capsulée.

La relation sérologique entre les mutantes acapsulées et les souches mucoïdes d'origine est confirmée par les réactions d'agglutination et de précipitation croisées.

L'agglutinabilité réduite ou bien l'inagglutinabilité des souches mucoïdes des *Klebsiella*, par rapport aux variantes « S » homologues, a été également signalée par GOSLING (12) et BARBARA READ (13).

Pour ce qui est de l'interprétation, notre point de vue se rapproche de celui d'ØRSKOV, qui considère que la grande quantité de substance polysaccharidique entrave la réponse immunologique de l'animal.

*En conclusion*: de l'étude immunobiologique comparative des 4 souches de *Klebsiella*, dont 2 souches mucoïdes KE52212 et KP et, 2 mutantes « S » homologues, il ressort:

— les colonies des mutantes, sont de type « S » constituées de germes non-capsulés;

— le test des acides organiques et de décarboxylase de la lysine et acide glutamique, distinguent la mutante E52212 de la souche mucoïde d'origine, tandis que la mutante P ne diffère de la souche d'origine capsulée que par le test de décarboxylase de l'ornithine;

— les tests de résistance aux drogues (streptomycine, érythromycine, nitrofuran ou sulfathiazole) différencient la variante E52212 de la souche d'origine capsulée sensible, tandis que le degré de résistance de la variante P ne diffère pas de la souche d'origine KP;

— les deux mutantes P et E52212 sont sensibles aux phages, tandis que les souches d'origine sont résistantes (KP et KE 52212) et l'une d'elle lysogène (KE 52212);

— la virulence pour la souris baisse 100 fois, pour la mutante E 52212 comparativement avec la souche d'origine, tandis que la variante P est aviruelente, ainsi que la souche dont elle dérive;

— les cultures des mutantes sont agglutinées par les anti-sérums homologues, ainsi que par les sérums hétérologues (anti KE52212 et anti KP (1/1280)) différant des souches d'origine çapsulées, qui sont faiblement agglutinées (1/20, 1/160) par les anti-sérums homologues et hétérologues (antivariantes);

— les sérums préparés avec des suspensions microbiennes de mutante (surtout le sérum anti E52212 S) possèdent une capacité remarquable de combinaison, aussi bien avec les polysaccharides homologues qu'avec les polysaccharides des souches mucoïdes d'origine, prouvant l'étroite liaison des mutantes avec les souches capsulées dont elles dérivent;

— à partir des mutantes, on a isolé une nucléoprotéine spécifique non-signalée jusqu'à présent.

BIBLIOGRAPHIE

1. CIUCĂ, M. STAMATESCO-EUSTATZIOU, S., BARBER, C. VOINEA M. et TULPAN, G. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 347.
2. GRINBAUM F.T., et KUDLAI O.G. — Jurn. Microb., Epidemiol. i Immunobiol., 1959, No. 5. 9.
3. KAUFFMANN, F. et MOLLER V. — Acta path. et microbiol. Scand., 1955, **36**, 178.
4. KAUFFMANN F. et PETERSEN. — Acta path. microb. Scand., 1956, **38**, 481.
5. BALŞ M. — Medicina Internă, 1957, 599.
6. BARBER, C. STAMATESCO-EUSTATZIOU S. et WISNER B. — J. Hyg. Epidemiol., Mikrob. a Immunol., 1958, **III**, 57.
7. KAUFFMANN, F. — Enterobacteriaceae, 1951.
8. TOMCSIK I. — Bacterial Anatomy, Cambridge, 1956, 42.
9. ADAMS H. et BOHAN PARK. — Virology 1956, **2**, 719.
10. EDWARDS P. et FIFE. M. — J. Infect. Diseases 1952, **91**, 52.
11. ØRSKOV. — Acta path. et microb. Scand. 1956, **38**, 375.
12. GOSLINGS. — Zblt. f. Bakt. Orig., 1935, **134**, 195.
13. READ. B. — J. of Bacteriol., 1957, **73**, 765.

## К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИИ КЛЕБСИЕЛ

### II. БИОЛОГИЧЕСКОЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ 2 „S" ВАРИАНТОВ КЛЕБСИЕЛ


КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Сравнительное иммунологическое изучение 4 штаммов клебсиел, из которых 2 штамма Е 52212 и Р мукоидные и обладают капсулой и 2 мутанты В 52212 и Р в форме « S » и лишенные капсулы, дало возможность установить следующее:

— « S » колонии мутантов состоят из лишенных капсулы микробов.

— Тесты органических кислот, тесты декарбоксиляции лизина и глютаминовой кислоты, тест вирулентности, устойчивости к антибиотикам выявляют большие различия между вариантом Е 52 212 и исходным (мукоидным) штаммом.

— В то же время « Р » мутанта отличается от исходной клетки только при помощи теста декарбоксиляции орнитина.

— Оба мутанта Е 52212 и Р, появившиеся спонтанным образом-лизочувствительны, в то время как капсулированный исходный штамм Е52212 является лизогенным.

— Выделен специфический нуклео- протеин еще не описанный у клебсиел, общий также и для « S » мутантов Е52212 и Р.

— Сыворотки, приготовленные с микробными взвесями мутантов (в частности мутанта Е 52 212) обладают выраженной способностью к соединению как с гомологичными полисахаридами, так и с полисахаридами исходных штаммов, свидетельствуя о их тесном родстве.

Культуры мутантов агглютинируются (1/1280) гомологичными антисыворотками также как и сыворотками против — К, Е 52212 и Р, в отличии от исходных капсулированных штаммов, которые слабо агглютинируются (1/20—160) гомологичными и гетерологичными против мутантов антисыворотками .

В нашей работе мутанта Е 52212 (спонтанно появившаяся) « S » формы, отличающаяся от мукоидного штамма, от которого она происходит, состоит из лишенных капсул микробов, устойчивых к антибиотикам, чувствительных к бактериофагу, с различной энзиматической деятельностью (положительный тест декарбоксилауии лизина и глютаминовой кислоты) с вирулентностью в 100 раз ниже и однако серологически в родстве с исходным штаммом и более ангтигенный чем последний.


## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER BIOLOGIE DER *KLEBSIELLEN*

### II. BIOLOGISCHE UND IMMUNOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER ZWEI "S„-VARIANTEN VON *KLEBSIELLA*


ZUSAMMENFASSUNG

Eine vergleichende immunologische Untersuchung von 4 Klebsiellastämmen, davon 2 bekapselte, mukoide Stämme, KE 52212 und KP und 2 kapsellose « S »-Mutanten, E52212 und P, führte zu folgenden Ergebnissen:

— Die « S »-Kolonien der Mutanten bestehen aus kapsellosen Keimen.

— Durch ihr Verhalten in den Proben auf organische Säuren durch den positiven Ausfall der Proben auf Lysin-und Glutaminsäuredecarboxylasen, durch die 100 mal geringere Virulenz und durch ihr Verhalten bei der Prüfung auf die Widerstandsfähigkeit gegen Antibiotika, unterscheidet sich die Variante E52212 weitgehend vom (Mukoiden) Ursprungsstamm, während die Mutante P nur durch den Ornithindecarboxylasetest vom ursprünglichen Stamm abweicht.

— Beide Mutanten, E52212 und P, die spontan auftraten, sind lysosensibel, während der bekapselte Ursprungsstamm KE52212 lysogen ist.

— Es wurde ein bisher bei Klebsiellen nicht beschriebenes spezifisches Nukleoproteid isoliert, das auch bei den Mutanten E52212 und P vorkommt.

— Die mit Bakterien Aufschwemmungen der Mutanten (insbesondere der Mutante E52212) hergestellten Sera, besitzen eine ausgeprägte Kombinationsfähigkeit sowohl gegenüber den homologen Polysacchariden, als auch gegenüber den Polysacchariden der Ursprungsstämme, woraus die enge serologische Verwandtschaft zwischen den ersteren und den letzteren hervorgeht.

— Die Mutantenkulturen werden von homologen Antisera, sowie von den Sera anti-KE52212 und anti-KP agglutiniert (1/1280), zum Unterschied von den bekapselten Ursprungskulturen, die von homologen und heterologen (anti-Mutanten) Sera nur schwach agglutiniert werden. Die Mutanten besitzen also eine stärker ausgeprägte Antigenität als die Ursprungsstäme.

## CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE BIOLOGY OF THE *KLEBSIELLAE*

### II. A BIOLOGICAL AND IMMUNOCHEMICAL STUDY OF 2 "S,, VARIANTS OF *KLEBSIELLA*.

SUMMARY

A comparative immunological study of 4 Klebsiella strains, out of which 2 capsulated mucoid strains, KE 52212 and KP, and 2 non — capsulated « S » mutants, E 52212 and P, resulted in the following findings:

— The « S » colonies of the mutants consist of non-capsulated germs.

— By its behaviour in organic acid tests, by the positive outcome of the lysine and glutamic acid decarboxylase tests, by its 100 times lower virulence, and by its different resistance to antibiotics, the variant E 52212 differs considerably from its (mucoid) strain of origin, while the P mutant only differs from the original strain by the outcome of the ornithine decarboxylase test.

— Both mutants, E 52212 and P, appeared spontaneously and are lysosensitive, while the capsulated original strain KE 52212 is lysogenic.

— A specific nucleoprotein has been isolated which has not been hitherto described in the Klebsiella and is present in the « S » mutants E.52212 and P as well.

— The sera prepared with bacterial suspensions of the mutants (of the mutant E 52212 in particular) display a marked ability to combine with the homologous polysaccharides as well as with the polysaccharides of the original strains, thus proving the close serological relationship between the former and the latter.

— The cultures of the mutants are agglutinated (1/1280) by homologous antisera as well as by anti — KE 52212 and anti-KP sera, in contradiction to the original capsulated cultures which are but weakly agglutinated (1/20, 1/160) by homologous as well as by heterologous (anti-mutant) sera. This shows the mutants to possess a higher antigenic potency than the original strains.

# RECHERCHES SUR LES HAPTÈNES DU *BACILLE ANTHRACIS* ET LEUR LOCALISATION DANS LA CELLULE BACTÉRIENNE

par

CELLA BARBER, AL. PETROVICI, EUGENIA ZILIŞTEANU et I. NAFTA

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de Biochimie générale et du Charbon)*

— Manuscrit reçu le 7 avril 1960 —

Le problème de la localisation des antigènes dans les différentes structures des germes est de plus en plus discuté ces dernières années (3, 11).

En ce qui concerne le *Bacillus anthracis*, TOMCSIK (13) est un des premiers auteurs qui a démontré la présence des antigènes spécifiques et il a essayé de prouver les différences immunobiologiques entre le soma et la capsule du bacille. IVANOVICS est également préoccupé, dès les premières recherches sur ce germe, des problèmes liés au charbon. Dans un récent travail, (8) cet auteur, tout comme SMITH et coll. (12) considère que l'antigène somatique du bacille charbonneux est un polymère de glucosamine et galactose étroitement connexé avec un peptide consistant de plusieurs aminoacides. A cause du nombre très limité des souches étudiées, il a été difficile de décider si ce polysaccharide est une componente caractéristique, et ceci d'autant plus que la réaction Ascoli a été trouvée positive dans seulement 50% des cas des souches étudiées par JENSEN et KLEEMAYER en 1953 (9).

Par l'analyse d'autolysats et de polysaccharides purifiés de 26 souches différentes, (dont 5 sont des variantes rough) effectuée à l'aide du test de double diffusion en gel d'agar et utilisant un sérum de cheval, dépourvu d'anticorps antipolypeptidiques, IVANOVICS arrive à identifier la présence du polysaccharide spécifique dans toutes les souches étudiées. L'auteur est d'accord avec SMITH et coll. que c'est des parois cellulaires que provient ce polysaccharide et croit que l'hétérogénéité apparente des souches d'Anthrax, étudiées par JENSEN et KLEEMAYER, doit être attribuée soit aux erreurs de préparation des extraits, soit aux sérums utilisés. Si les méthodes d'isolement (des autolysats de germes ou de milieu de culture) des polysaccharides ne peuvent donner des indications précises sur la localisation de ces derniers dans la paroi cellulaire ou dans d'autres éléments de la structure cellulaire, les réactions spécifiques des parois décrites par TOMCSIK, prouvent que le polysaccharide isolé est une componente des parois cellulaires. La confirmation de cette localisation topographique est raffermie par les recherches de SMITH et coll. (12).

Comme TOMCSIK (14), IVANOVICS considère que le mannane de CAVE-BROWN-CAVE (7) est un contaminant du milieu de culture, attendu qu'on l'a isolé seulement des germes non-lavés.

Dans des recherches antérieures (4, 5, 6) utilisant des cultures mucoïdes de *B. anthracis* et des variantes « R » des mêmes souches, nous avons réussi à isoler à partir des *germes lavés* provenant des cultures mucoïdes, cultivés sur un milieu sans levure, deux polysaccharides, dont l'un constitué de galactose et hexosamines, et l'autre, isolé en état de haute polymérisation, constitué de plusieurs oses. Le polymère était connexé avec de petites quantités d'acide polyglutamique pour les cultures de 20 heures; chez les cultures de 48 heures, les polymères isolés, contenaient surtout de l'acide polyglutamique. Appliquant les mêmes méthodes d'extraction, nous n'avons pas réussi à obtenir des polysaccharides spécifiques à partir des variantes « R »; pour parvenir à les isoler de ces souches, des méthodes beaucoup plus drastiques ont été nécessaires et, bien que la richesse en glucides des germes totaux, ne différait pas trop de celle des souches mucoïdes, le rendement des polysaccharides isolés était beaucoup plus petit. Nos conclusions étaient que: pour les souches « R » il existe une beaucoup plus étroite connexion entre le polysaccharide et la cellule microbienne. Ces conclusions sont confirmées par les résultats obtenus par Tomcsik et coll. (2, 14). Ces auteurs ont pu extraire, en totalité, des haptènes muco-polysaccharidiques du *B. anthracis*, à l'aide de l'antiformine, utilisant les parois cellulaires vidées d'autres éléments.

Quant à l'haptène polypeptidique, dont la localisation dans la capsule est établie par l'unanimité des auteurs, nous l'avons isolée de la souche mucoïde en grandes quantités et en état de haute polymérisation (5).

Selon la définition même de Tomcsik et coll. (1, 2) la capsule bactérienne est de consistance gélatineuse, à grand contenu d'eau (98%); elle ne fournit pas un bon matériel pour la microscopie électronique, c'est pourquoi il y a peu de micrographies électroniques de ce point de vue. Le matériel capsulaire dans la majorité des cas est tellement rabougri et déformé qu'on ne peut le distinguer de la paroi cellulaire, ou bien il apparaît comme une couche irrégulière, mince, qui entoure la cellule. Les grandes quantités (20—25%) de polymères isolés par nous, ne pouvaient résider dans une pareille structure.

Dans le but de montrer la localisation des haptènes du bacille charbonneux dans les souches mucoïdes et les variantes « R » de ces souches, nous présentons dans ce travail les micrographies électroniques des germes étudiés par nous, avant l'application des techniques d'extraction des haptènes polysaccharidiques ou polypeptidiques et après les différentes phases de traitement avec les divers liquides d'extraction. Les polysaccharides, aussi bien que l'acide polyglutamique des souches mucoïdes ont été extraits en état de haute polymérisation, c'est-à-dire, dans la phase la plus proche de celle où ils se trouvaient dans la cellule.

Nous présentons de même, les relations immunologiques des substances spécifiques isolées avec les sérums immuns de lapin obtenus avec les souches mucoïdes et les variantes rough de ces souches et avec un sérum immun de cheval, préparé avec une souche rough.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les polysaccharides, l'acide polyglutamique et la nucléoprotéine utilisés dans les tests de précipitation en gel d'agar, ont été isolés des souches mucoïdes et des variantes rough, par les techniques décrites antérieurement (4, 5, 6).

Les réactions de double diffusion en gel d'agar ont été effectuées selon la méthode d'Ouchterlony (10).

Les sérums immuns de lapin ont été obtenus avec des souches mucoïdes et des variantes « R » (C1190 et C12). On a utilisé dans la réaction un sérum de cheval immunisé avec la souche 1190R. Pour les micrographies électroniques, les germes séchés par acétone, utilisés pour l'extraction des haptènes, ont été lavés deux fois à l'eau bi-distillée par centrifugation, avant ainsi qu'après chacune des extractions des haptènes.

Le lavage et séchage à l'acétone des germes, avant et après le traitement au phénol 90% ayant produit une agglomération de germes que nous n'avons pas toujours réussi à séparer lors des traitements ultérieurs, font que les micrographies montrent également des germes qui ont échappés au traitement auquel la masse bactérienne a été soumise.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le traitement au phénol 90% dissout, à partir des souches mucoïdes, une quantité de matériel correspondant à approximativement 20% du poids sec des germes; de ce matériel, après précipitation à l'alcool de l'extrait phénolé, on récupère un polysaccharide, constitué de galactose et hexosamines à un rendement variable avec la souche analysée (2,5—6,5%). Lorsque il s'agit des variantes « R », le phénol dissout 10—20 gr% de la substance sèche des germes, mais seulement une quantité infime d'une mucoprotéine spécifique (0,5 gr%) est soluble après précipitation à l'alcool et dialyse.

Après l'extraction au phénol, les germes sont lavés à l'acétone, jusqu'à disparition du phénol, et séchés (v. planche II a et b..).

L'aspect des germes mucoïdes est différent de celui des variantes « R »; les polymères de polysaccharide et polypeptide n'ont pas encore été isolés des cellules mucoïdes (à l'exception des quantités de substances, lesquelles étant très solubles passent dans les eaux de lavage des germes préparés pour les micrographies électroniques); des cellules des souches « R » on n'a pas encore extrait la nucléoprotéine.

Dans cette phase, les germes des deux variantes, qui sont suspendus dans la solution de chlorure de sodium 0,90% et maintenus 24 heures à 37°, élibèrent dans le cas des souches mucoïdes des polymères constitués de polysaccharide et de polypeptide, tandis que les souches « R » laissent passer dans la solution une nucléoprotéine spécifique.

Les micrographies électroniques montrent qu'aussi bien les cellules M que les cellules « R » sont vidées de la plus grande partie de leur contenu (planche III a et b).

Jusqu'à présent le polysaccharide n'a pas encore été isolé des souches « R ».

Nous rappelons que dans nos recherches antérieures (5) nous avons isolé dans cette phase le polysaccharide des variantes « R » (dont nous ne connaissions pas à cette date l'aspect micrographique) par l'autoclavage des germes, suivi d'une extraction à ClH 0,5% pendant une heure sur bain-marie bouillant.

Une extraction comparative des souches mucoïdes dans cette phase, sépare encore de petites quantités de polypeptide et polysaccharide, constitués seulement de galactose.

Par cette technique ont été isolées les haptènes de trois souches mucoïdes ou smooth et de deux souches rough; un total de 18 récoltes ont été analysées.

Les réactions de double diffusion en gel d'agar, obtenues avec les haptènes isolées et les sérums immuns homologues et hétérologues ont montré que:

Le sérum antimucoïde de lapin réagit par deux bandes de précipitation avec les polymères des souches mucoïdes constitués d'acide polyglutamique et polysaccharide, et par une seule bande de précipitation avec le polysaccharide (I) homologue et hétérologue, ainsi qu'avec le polysaccharide de la souche rough.

Le sérum anti-R de lapin, dépourvu d'anticorps antipolypeptidiques, réagit par une seule bande de précipitation avec n'importe lequel des polysaccharides, soit que ces derniers sont ou non connexés avec le polypeptide, soit qu'ils sont des polysaccharides dépourvus initialement de polypeptide.

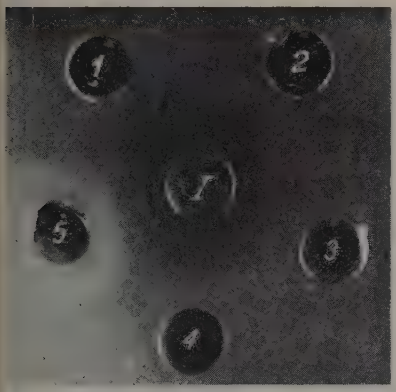
Le sérum de cheval, dont les bandes de précipitation sont en général plus minces que celles obtenues avec le sérum de lapin R, présente une seule bande de précipitation avec tous les polysaccharides, isolés à partir des souches M ou à partir des souches R et avec la nucléoprotéine, isolée des variantes « R ».

Les polysaccharides ont une grande vitesse de diffusion, c'est pourquoi nous avons été obligés le plus souvent de laisser diffuser d'abord le sérum pendant 24 heures et mettre ensuite les polysaccharides dans la réaction. C'est à partir des précipitations croisées des antigènes et des sérums anti-charbonneux qu'est mise en évidence l'homogénéité des polysaccharides isolés des souches capsulées avec les polysaccharides des variantes « R », la différence consistant seulement dans la difficulté de séparer les polysaccharides à partir des souches « R ».

Tel qu'il ressort des techniques d'extraction, appliquées au deux variantes, et de la morphologie des cellules examinées au microscope électronique après chaque étape d'extraction des haptènes, alors que des germes mucoïdes de grandes quantités de matériel soluble ont été extraites (polysaccharide et polypeptide), les cellules des germes „R", presque vidées de contenu, n'ont pas encore élibéré de polysaccharide qui ne sera isolé qu'ultérieurement. Quant aux variantes „R" du bacille charbonneux, nos résultats sont en accord avec tous les travaux récents qui isolent les polysaccharides des cellules vidées du matériel soluble, donc des parois cellulaires; mais lorsqu'il s'agit des souches mucoïdes, le matériel abondant, constitué de polypeptide et polysaccharide, est dispersé dans toute la cellule, d'où il passe aisément en solution après le traitement des germes au phénol 90%.

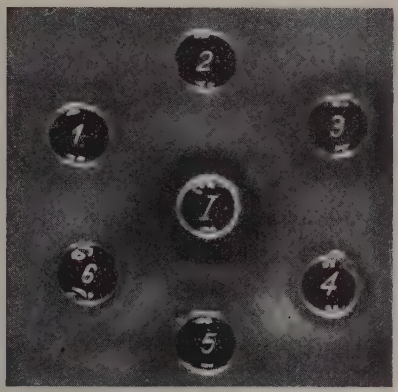
*En conclusion*: On présente les micrographies électroniques qui illustrent la morphologie du bacille charbonneux, souches mucoïdes et variantes rough en différentes phases d'extraction des haptènes polysaccharidiques et polypeptidiques. Les germes des souches mucoïdes contiennent des haptènes facilement solubles: un polysaccharide soluble en phénol 90%, constitué de galactose et hexosamine et un complexe polymérisé de polysaccharide avec acide polyglutamique, qui se présente dispersé dans toute la cellule et qui est facile à isoler par solubilisation en eau distillée ou en solution de ClNa 0,90% après traitement des germes au phénol.

Les germes des souches « R », soumis aux mêmes méthodes d'extraction, cèdent une quantité comparable de matériel soluble dans le phénol 90%, mais que ce dernier dénature (sauf un infime pourcentage, 0,50 gr%). Consécutive-



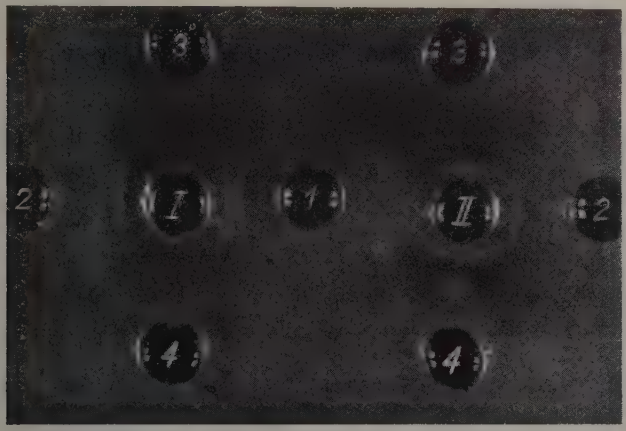

*Photographie I:* Réaction de double diffusion en gel d'agar entre l'antisérum (1190 R) de cheval et les polysaccharides homologues et hétérologues.

1 = Polysaccharide 12 M (I); 2 = Polysaccharide 12 R; 3 = Polysaccharide 1190 R; 4 = Polysaccharide C 95; 5 = Polysaccharide polymérisé 12 M II (polysaccharide et polypeptide)




*Photographie II:* Réactions de double diffusion en gel d'agar entre l'antisérum de lapin 1190 R et différents polysaccharides

1 = Polysaccharide 12 (M I); 2 = Polysaccharide 1190 (Sm I); 3 = Nucléoprotéine (12 R); 4 = Polysaccharide polymérisé (12 M) 5 = Polysaccharide (C 95); 6 = Polysaccharide polymérisé (1190 polysaccharide + polypeptide)




*Photographie III:* Réactions de double diffusion en gel d'agar entre des sérums charbonneux de lapin et haptènes homologues et hétérologues.

I antisérum C 12 mucoïde; II antisérum C 12 « Rough »; 1 = polymère C 12 M (polysaccharide + polypeptide); 2 = polymère 1190 (polysaccharide + polypeptide); 3 = polysaccharide 12 M (I); 4 = polysaccharide 12 R

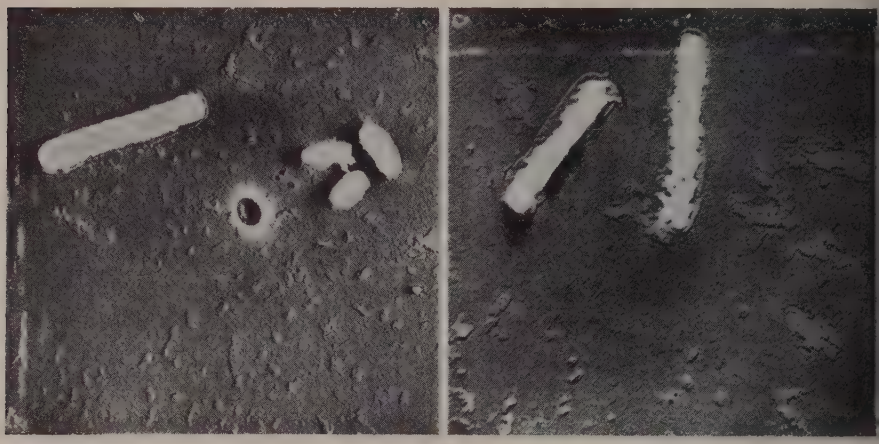


*Planche I* a. — *B. anthracis*. Cellules de la souche mucoïde (12)

ment, on a isolé à partir des variantes « R » une nucléoprotéine spécifique. Avec les mêmes techniques on n'a pu extraire le polysaccharide; celui-ci est isolé des cellules vidées de la majorité de leur contenu, tel que leur morphologie apparaît au microscope électronique dans cette phase, par le ClH 0,5% au bain marie bouillant, ou par n'importe quelle autre méthode d'extraction des polysaccharides.

Dans les réactions de double diffusion en gel, toutes les haptènes isolées réagissent avec des sérums homologues et hétérologues de lapin et cheval.

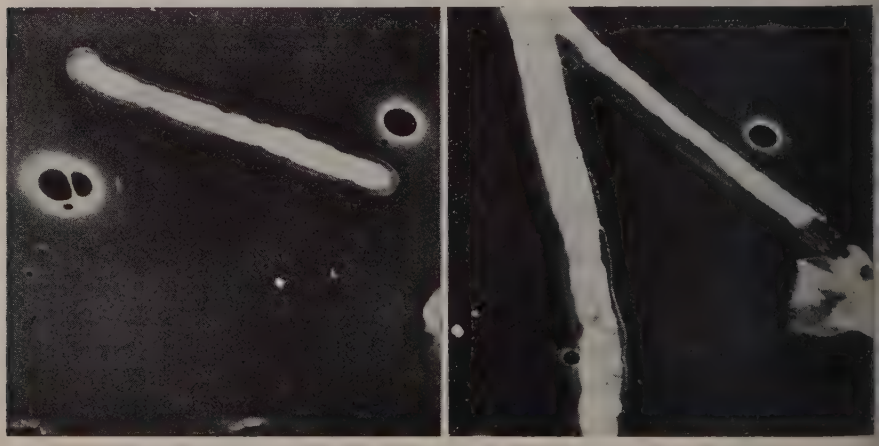


*Planche I* b. — *B. anthracis*. Cellules de la variante « Rough » (12)

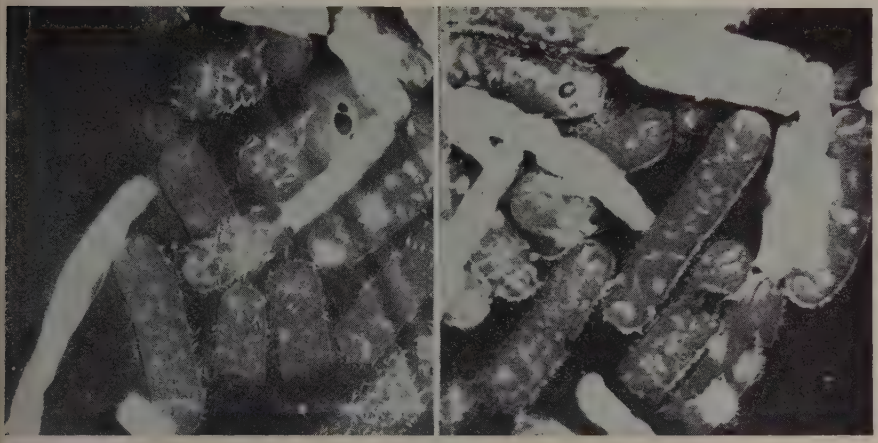


*Planche II* a. — *B. anthracis.* Cellules de la souche mucoïde traitées au phénol 90% et lavées.
Les polymères de polypeptide et polysaccharide n'ont pas été isolés encore

Les polysaccharides des différentes souches constituent du point de vue sérologique un type unique, le sérum anti-rough de lapin (C 12 ou 1190) ou de cheval (C1190) réagissant par une seule bande de précipitation, tant avec les polysaccharides des souches mucoïdes homologues et hétérologues (C 12

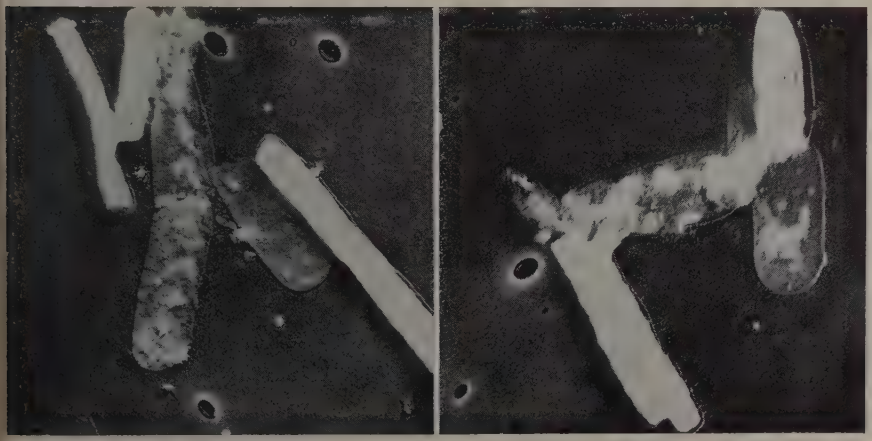


*Planche II* b. — *B. anthracis.* Cellules de la variante « Rough » traitées au phénol 90% et lavées. Seules des protéines dénaturées ont été séparées. Reste à être isolée une nucléoprotéine spécifique

*Planche III* a. — *B. anthracis.* Cellules de la souche mucoïde. Les polysaccharides spécifiques et l'acide polyglutamique ont été séparés

et C 1190), qu'avec les polysaccharides isolés d'autres souches de bacille charbonneux (C95); l'antisérum mucoïde (C 12 et C1190) donne la même bande unique de précipitation avec les polysaccharides purifiés, isolés soit de la souche M soit de la souche « R », et deux bandes de précipitation avec le polysaccharide connexé avec l'acide polyglutamique. L'acide polyglutamique donne une

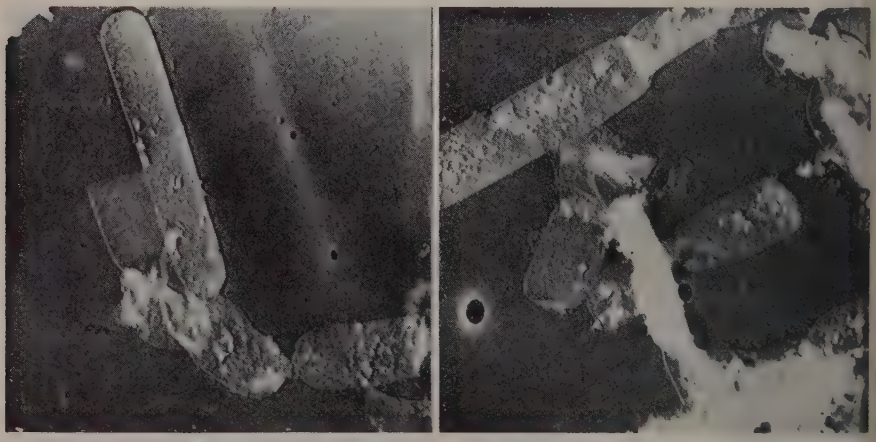


*Planche III* b. — *B. anthracis.* Cellules de la variante « Rough »; bien que presque vidées de contenu, les polysaccharides n'ont pas encore été isolés, ces derniers seront isolés des parois cellulaires

ule bande de précipitation avec les sérums antimucoïdes homologues et hété-logues. Il faut relever la très rapide diffusion en gel des haptènes polysaccha-diques, nécessitant souvent l'opération de diffusion préalable de l'antisérum, in d'interpréter la réaction.

BIBLIOGRAPHIE


. Bauman-Grace Joice et Tomcsik J. — Schweiz. Zt. f. allg. Path. u. Bakt., 1958, **21**, 906.
. Bauman-Grace Joice, Kovacs H. et Tomcsik J. — Schweiz. Zt. f. allg. Path. u. Bakt. 1959, **22**, 158.
. Barron L.S. et Carrey W.F. — J. Immunol., 1959. **83**, 517.
. Barber C. Ziliṣteanu E. et Nafta I. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbio-logie, 1957, **16**, 573.
. Barber C. Ziliṣteanu E. et Nafta I. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbio-logie, 1958, **17**, 279.
. Barber C. Ziliṣteanu E. et Nafta I. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbio-logie, 1959, **18**, 27.
. Cave-Brown-Cave. — J. Chem. Soc., 1954, 3866.
. Ivanovics G. et Foldes J. — Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1958, **5**, 89.
. Jensen J. et Kleemayer H. — Zblt. f. Bakt. Orig. I., 1953, **159**, 494.
. Ouchterlony O. — Acta Path. Microbiol., Scand., 1949, **26**, 507.
. Ribi E., Kelsey Milner et Pierrnie T. — J. Immunol., 1958, **82**, 75.
. Smith H., Strange R. et Zwartouw H. — Nature, 1956, 865.
. Tomcsik J. — Zblt, f. Bakt. Orig. I., 1958, **173**, 361.
. Tomcsik J. et Bauman-Grace Joice. — Schweiz. Zt. f. allg. Path. u. Bakt., 1959, **22**, 144


ЗУЧЕНИЕ ГАПТЕНОВ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ПАЛОЧКИ И ИХ РАЗМЕЩЕНИЯ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ


Приложены электронные микрографии, показывающие морфологию сибиреязвенной лочки в различных моментах экстракции полисахаридных и полипептидных гаптенов из коидных штаммов и шероховатых вариантов. Микробы мукоидных штаммов содержат гко растворимые гаптены: полисахарид из галактозы, гексозамин и полимеризованный мплекс полисахарида с полиглютаминовой кислотой, рассеянный по всей клетке и легко иделяемый путем расстворения в воде или в 0,90% -ном растворе cl Na после обработки кробов карболом.

Микробы шероховатых штаммов, подвергнутые тем же способам экстракции, осво-ждают в 90% -ный карбол приблизительно одинаковое количество материала, приэтом рбол денатурирует данный материал (с исключением ничтожного процента: 0,50 гр%) лед за этим из шероховатых вариантов выделяется специфический нуклеопротеин. При мощи той же методики не удалось экстрагировать полисахарид; таковой экстрагируется клеток, из которых, большинство содержимого было удалено (как следует из электро-микроскопических исследований), путем выдерживания на водяной бане в присутствии Н 0,5%, в течении часа, или при помощи любого друго способа отделения полисахаридов.

В реакциях двойной диффузии в геле, все выделенные гаптены реагируют с гомоло-ными и гетерологичными кроличьими и лошадиными сыворотками.

Только полиглютаминовая кислота, присутствующая только в мукоидных штаммах, гагирует только с антисывороткой мукоидных штаммов, ибо сыворотки против шеро-ватых вариантов не содержат антитела против полипептидов.

Полисахариды разных штаммов составляют с серологической точки зрения один т; кроличья (с 12 или 1190) или лошадиная (С 1190), дают единственную полосу преци-итации как с полисахаридами гомологичных и гетерологичных мукондных штаммов 12 и С 1190) так и с любым другим полисахаридом, выделенным из других штаммов сиреязвенной палочки (95); мукоидная антисыворотка (С 12 и С 1190) дает ту же инственную полосу преципитации с очищенными полисахаридами из мукоидных или

шероховатых штаммов, и две полосы преципитации с полисахаридом, связанным полиглютаминовой кислотой. Полиглютаминовая кислота дает единственную полосу преци питации с противомукоидными гомологическими и гетерологическими сыворотками Отмечается очень скорая диффузия в геле полисахаридных гаптенов; нередко необходим предварительная диффузия сыворотки, для интерпретации реакции.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE HAPTENE DES *ANTHRAX BACILLUS* UNI IHRE LOKALISATION IN DER BAKTERIENZELLE

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden Elektronenmikrographien vorgelegt, welche die Morphologie des Anthrax bacillus in verschiedenen Phasen der Extraktion der polysaccharidischen und polypeptidische Haptenen aus mukoiden und « Rough »-Varianten wiedergeben. Die Keime mukoider Stämme enthalten leicht lösliche Haptene: ein in 90 prozentigem Phenol lösliches, aus Galaktos und Hexosaminen bestehendes Polysaccharid und ein polymerisierter, aus einem Polysacchari und Polyglutaminsäure gebildeter Komplex, der über die ganze Zelle verteilt ist und durc Lösung in Wasser oder 0,90 prozentiger Kochsalzlösung, nach Behandlung der Keime mi Phenol, leicht isoliert werden kann.

Werden Keime der „Rough"-Stämme denselben Extraktionsverfahren unterzogen, s geben sie an 90 prozentiges Phenol etwa die gleiche Menge Material ab, das aber (bis au einen ganz geringen Prozentualanteil: 0,50 g%) durch Phenol denaturiert wird. Ausschlies send, wurde aus den „Rough-"Varianten ein spezifisches Nukleoprotein isoliert. Polysaccha ride könnten, mit den oben angegebenen Methoden nicht extrahiert werden.

Erst nachdem den Zellen, wie aus ihrer Morphologie im Elektronenmikroskop hervor geht, der grösste Teil ihres Inhalts entzogen worden ist, gelingt es Polysaccharide zu extra hieren und zwar in dieser Phase, durch Erwärmen während einer Stunde im Wasserbad mi 0,5 prozentiger Salzsäure oder durch jedes andere Verfahren der Polysaccharidextraktion

In Doppeldiffusionsreaktionen in Gelen reagieren alle isolierten Haptene mit homologe und heterologen Kaninchen- und Pferdesera.

Allein die Polyglutaminsäure, die ausschliesslich in mukoiden Stämmen vorkomm reagiert nur mit den Antisera gegen mukoide Stämme, da anti-„Rough" Sera keine antipoly peptidischen Antikörper enthalten.

Die Polysaccharide der verschiedenen Stämmen stellen, von serologischem Standpunkt einen einzigen Typus dar, da anti-„Rough" (C 12 oder 1190) Kaninchen- und (C. 1190 Pferdesera, sowohl mit den Polysacchariden homologer und heterologer (C 12 und C 1190 Mukoidstämme, als auch mit jedem aus anderen Stämmen von Anthraxbazillen (95) isolier ten Polysaccharid ein einziges Präzipitationsband ergeben. Mukoidsera (C 12 und C 1190 geben das gleiche, einzelne Präzipitationsband mit gereinigten Polysacchariden sowohl au M — als auch aus „Rough"-Stämmen und zwei Präzipitationsbänder mit dem an Polygluta minsäure gebundenen Polysaccharid. Polyglutaminsäure gibt mit homologen und heterologe Mukoidsera ein einziges Präzipitationsband. Es sei auf die äusserst rasche Diffusion de Polysaccharidhaptene in Gelen hingewiesen, was oftmals dazu zwingt, die Diffusion de Antiserums im vorhinein stattfinden zu lassen, um die Reaktion überhaupt deuten zu können

## INVESTIGATIONS CONCERNING THE HAPTENS OF THE *ANTHRAXA BACILLUS* AND THEIR LOCALIZATION IN THE BACTERIAL CELL

SUMMARY

The morphology of the anthrax bacillus in various phases of the extraction of polysac charidic and polypeptidic haptens from mucoid strains and R variants is illustrated by elec tron micrographs. The germs of mucoid strains contain readily soluble haptens, i.e. a poly saccharide which is soluble in 90 per cent phenol and consists of galactose and hexosamines and a polymerized complex of polysaccharide and polyglutamic acid which is dispersed through out the whole cell and may be readily isolated by solubilization in water or 0.90 per cen NaCl solution after previous treatment of the germs with phenol.

When germs of R strains are subjected to the same methods of extraction with 90 pe cent phenol, they will yield comparable amounts of material which is, however, denaturate by phenol (except for an exceedingly small fraction amounting to 0,50 g. per cent). Subse

uently, a specific nucleoprotein may be isolated from R variants. The attempt to extract olysaccharides by means of the above mentioned method was unsuccessful. However, from lls which have been emptied of most of their contents, as demonstrated by their morpho-gy in the electron microscope, polysaccharides may be extracted by treating them for one our with 0,5 per cent HCl in the water bath or by any other method of polysaccharide extraction.

In double diffusion reactions in agar gel, all the haptens isolated reacted with homo-gous or heterologous rabbit and horse sera, except for polyglutamic acid which is present mucoid strains only and will react exclusively with antisera against these strains, since nti-R sera do not contain antipolypeptidic antibodies.

From the serological point of view the polysaccharides of different strains belong to single type, since anti-R rabbit serum (C 12 or 1190) or horse serum (C 1190) will yield single precipitation band with the polysaccharides of homologous or heterologous mucoid rains (C 12 and C 1190) as well as with any polysaccharide isolated from other strains of nthrax bacilli (95). The anti-mucoid serum (C 12 and C 1190) gives the same unique band precipitation with purified polysaccharides isolated from M or from R strains, and two recipitation bands with the polysaccharide linked with polyglutamic acid. Polyglutamic id yields a single precipitation band with homologous or heterologous anti-mucoid sera. should be noticed that the extremely rapid diffusion of the polysaccharidic haptens in gel ften require a previous diffusion of the antiserum in order to make the reaction interpretable.

# SUR UN CAS DE « *LARVA MIGRANS* » VISCÉRALE

par

ANGELA SORESCO, D. PANAITESCO
*(Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service d'Helminthologie)*

V. POPESCO
*(Clinique de Chirurgie Maxillo-Faciale de l'Institut Médico-Pharmaceutique de Bucarest)*

— Manuscrit reçu le 30 mars 1960 —

La littérature de spécialité signale ces dernières années, à part la « *myiase rampante cutanée* » « creeping eruption » (produite chez l'homme par *l'Ankilostoma brasiliense* ou *Ankilostoma caninum*) une nouvelle maladie parasitaire « *la myiase rampante viscérale* », « larva migrans viscerale »*) ou « *toxocariase* »**) déterminée chez l'homme par ingération accidentelle d'œufs de *Toxocara canis* ou *Toxocara cati.*

Bien que des observations plus anciennes signalaient, au cours des infestations par œufs d'ascaris, la possibilité de cycles migrateurs anormaux chez les hôtes non-naturels, qui aboutissaient à l'élimination des larves imatures (KOINO 1932) et à la fixation des larves dans différents organes (fait dû à un procès d'immunité innée) produisant des granulomes à éosinophiles (FÜLLEBORN ou SIHOBALOVA) « la myiase rampante viscérale », n'a pu être différenciée comme entité clinique qu'en 1952, lorsque BEAVER et coll. lui ont accordé une description complète.

Certains aspects cliniques de cette maladie ont été signalés quelques années avant par PERLINGIERO et GYORGY (1947); ZUELZER et APT (1949); MERCER et coll. (1950); WILDER (1950); BEHLER (1951) et BEAUTYMAN et WOOLF (1951).

Selon FAUST (1957) cette maladie serait assez répandue dans le monde entier; plusieurs cas ont été décrits ces dernières années aux Etats-Unis d'Amérique.

L'agent étiologique de cette infection est l'ascaride du chien *(Toxocara canis)* et dans certains cas l'ascaride du chat *(Toxocara cati)*; selon NICHOLS (1956) la maladie pourrait être également provoquée par: *Ascaris lumbricoides*, *Ankylostoma caninum* ou éventuellement *Strongiloides stercoralis.*

La maladie atteint les personnes (généralement les enfants) qui ont un contact plus étroit avec les animaux, qui les infestent par voie orale avec des œufs d'ascaris (*T. canis* et *T. cati*). Après l'éclosion de la larve dans l'intestin de l'homme — hôte anormal — les larves envahissent l'intestin grêle, pénètrent dans les

*) selon FAUST E.C. (1957)

**) dénomination utilisée au Com. Mixte de l'OMS/FAO d'experts des Zoonoses, deuxième rapp. Stockholm Août 1958 — Genève OMS 1959.

veines *mésentériques ou les lymphatiques* et de là, par le courant sanguin, arrivent dans différents viscères ou dans les muscles, où elles déterminent une réaction de type granulomateux, qui arrête la migration.

Au niveau de l'arrêt des larves se forme un granulome de grandeur différente, formé de leucocytes, avec prédominance des éosinophiles et histiocytes; éventuellement ces nodules peuvent renfermer un nombre variable de cellules atypiques multinucléées, géantes, disposées concentriquement sur les fibres de collagène (Brill, 1953).

Au centre des granulomes on observe la larve, qui peut être identifiée par sa taille (longueur et épaisseur) et ses détails de structure (Nichols 1956).

Le nombre des lésions de type granulomateux est d'habitude en rapport direct avec la quantité d'œufs ingérés (Faust, 1957), la localisation la plus commune étant au foie (Dent, 1956). Suivent par ordre de fréquence les autres organes: poumon, reins, cœur, muscles striés et globe oculaire.

★

Nous avons eu récemment l'occasion de dépister en Roumanie une telle infestation chez une malade (E.M. âgée de 18 ans, du milieu rural), internée dans la Clinique de Chirurgie maxillo-faciale I.M.F.-Bucarest, en décembre 1956 pour une asymétrie faciale, déformation de la joue droite, produite par une tumeur de la région génio-massétérine droite, à évolution lente datant de 2—3 années, sans douleur ou autres troubles.

A l'examen local on observe une déformation tumorale, de consistance molle, les tissus de la région sont par endroit faiblement infiltrés et présentent à la palpation une série de petits nodules, d'environ 2—3 mm diamètre, durs, disséminés dans une région située entre les arcades zygomatiques et la marge inférieure de la mandibule. A la palpation, ces nodules sont légèrement sensibles.

L'examen radiologique de la région génio-massétérine droite montre une série de petites images radio-opaques, rondes, disséminées dans les parties molles, à aspect de corps étrangers (grains de plombs).

L'état général de la malade n'est pas modifié, elle est apyrétique; la vitesse de sédimentation et l'hémoleucogramme sont normaux.

A l'opération on a extrait des petites formations, les unes entourées de tissu cellulo-graisseux, les autres facilement énucléables des tissus avoisinants et de la masse du masséter, macroscopiquement normale. Ces nodules ont l'aspect de petits pois, gris-blanchâtre et de consistance quasi-dure.

Du point de vue post-opératoire la plaie guérit « per primam » dans un intervalle normal.

L'examen anatomo-pathologique des nodules prélevés chirurgicalement présente des granulomes de 2—3 mm diamètre, avec une zone centrale ramollie, dans l'intérieur de laquelle on distingue une larve de nématode. Cette larve a une longueur d'approximativement 230 microns et une épaisseur de 16—18 microns. Ces éléments comparés aux critères de diagnostic établis par Nichols (1956) nous ont fait supposer que la larve trouvée serait une larve de *Toxocara canis* (photos 1, 2).

Autour de la zone de nécrose centrale, on observe une infiltration leucocytaire à fréquents histiocytes, ainsi que des dépôts calcaires.

La description de ce cas (le premier en Roumanie) d'infestation humaine, avec larves d'ascarides provenant des animaux, soulève, à part la probabilité

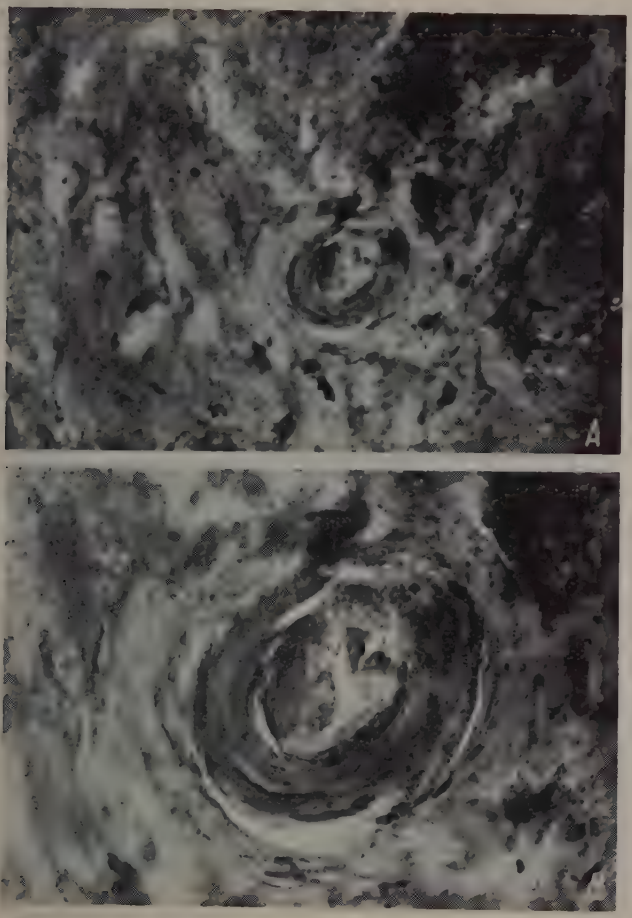



*Fig. 1* A et B: Section transve sale du granulome avec zone centrale où on observe la présence d'une larve de *Toxocara canis*

l'autres cas semblables, un problème tout particulier: la possibilité d'infestation multiple d'un seul muscle de l'organisme.

En ce qui concerne le premier problème, nous pensons que le fait d'avoir encontré ce cas, corroboré aux données plus importantes de la littérature, sur 'étiologie et la pathogénie de la maladie, suffit pour attirer l'attention des nédecins sur la possibilité d'autres cas similaires en Roumanie.

Quant au second problème, celui de la possibilité d'une infection multiple d'un seul muscle de l'organisme, malgré l'absence d'une symptomatologie qui puisse traduire cliniquement l'existence d'autres granulomes, nous ne sommes pas à même (pour le moment) de tirer une conclusion définitive.

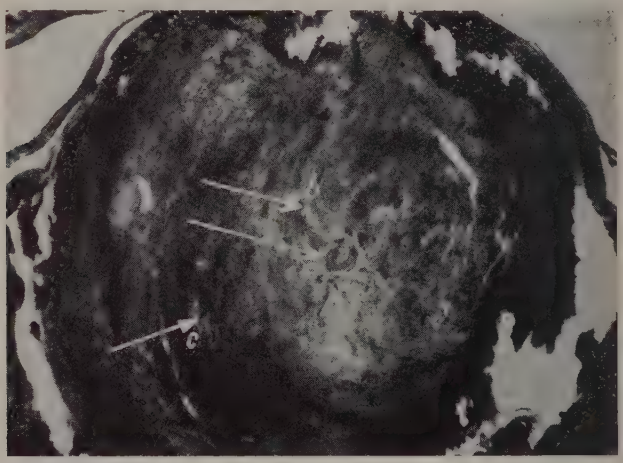



*Fig. 2:* Section transversale d'un granulome. On distingue: a. zone centrale avec une larve de *Toxocara canis;* b. zone de milieu, formée de leucocytes; c. zone périphérique avec fibres concentriques de collagène

Il est possible que la riche vascularisation de ce muscle, explique la localisation d'un groupe de larves provenant de l'intestin par voie hématogène, mais il est tout aussi probable que, des granulomes semblables, plus réduits en nombre, puissent exister aussi dans d'autres organes, où ils déterminent des infestations plus discrètes, la présence de larves ne se traduisant cliniquement par aucun symptôme. Jusqu'à présent, l'évolution de la maladie plaide pour cet argument, dans le sens que l'apparition de formations tumorales, chez notre malade, n'a pas été précédée et suivie par aucune manifestation clinique; l'évolution ultérieure nous renseignera sur l'éventuelle existence de localisations dans d'autres organes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arean V.M. — Arch. Pathology, 1958, **66,** 427.
2. Beautyman W. et Woolf A.L. — J. Pathol. and Bact., 1951. **63,** 635.
3. Beaver P.C., Snyder C.H., Carrera G.M., Dent J.H. et Lafferty J.W. — Pediatr., 1952, **9,** 7.
4. Beaver P.C. — Parasitological Rev. Sect. of Exp. Parasitology, 1956. **5,** 587.
5. Behrer M.R. — J. Pediatr., 1951. **38,** 635.
6. Brill R., Crug J. et Beaver P.C. — Am J. Clin. Pathol., 1953. **23,** 1208.

7. Dent J.H., Nichols R.L., Beaver P.C. et Carrera G.M. — Am. J. Pathol., 1956. **32**, 777.
8. Faust E.C. et Craig. — Clin. Parasitol., 1957.
9. Nichols R.L. — J. Parasitol., 1956. **42**, 349.
10. Nichols R.L. — J. Parasitol., 1956. **42**, 363.
11. Perlingiero J.G. et Gyorgy P. — Am. J. Dis. Child., 1947. **73**, 34.

## О СЛУЧАЕ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ « *larva migrans* »

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы сообщают о случае висцеральной larva migrans (ползучий висцеральный миазис или токсокариаз), появившийся у человека после случайного поглощения яиц Toxocara canis Из этих яиц, попавших в кишечник, вылупившиеся личинки проходят атипичный цикл переселений у человека, который является неестественным хозяином и локализовались в описанном авторами случаев правой челюстной мышце, образуя множественный гранулематоз с псевдоопухолевой картиной.

В гистопатологических срезах материала, полученного операторным путем, авторы нашли в центре каждой грануломы личинку нематода, идентифицированную по деталям строения, описанным в литературе по специальности, как личинку Toxocara canis.

В виду того, что данное заболевание было недавно описано в литературе (1952), авторы цитируют этот случай в целях обратить внимание врачей на возможность существования других подобных заболеваний в нашей стране.

## ÜBER EINEN FALL VON *LARVA MIGRANS-VISCERALIS*.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser beschreiben einen Fall von *Larva migrans-visceralis (Myiasis reptans visceralis* oder Toxocariasis*)* bei einem menschlichen Individuum. Die Erkrankung wurde vermutlich durch das zufällige Verschlucken der Eier von *Toxocara canis* hervorgerufen. Die Larven, die im Darm aus diesen Eiern ausschlüpften, führen beim Menschen, der einen unnatürlichen Wirt darstellt, einen atypischen Wanderungszyklus aus. Im vorliegenden Falle setzten sie sich im rechten M. masseter fest und verursachten eine multiple Granulomatose von geschwulstartigem Aussehen.

In den histologischen Schnitten des durch Operation gewonnenen Materials fanden die Verfasser in der Mitte jedes Granuloms eine Nematodenlarve, die nach den in der Fachliteratur beschriebenen Struktureinzelheiten als Larve von *Toxocara canis* identifiziert wurde.

Da diese Krankheit, als nosologische Einheit, erst kürzlich in der Literatur beschrieben wurde (1952), berichten die Verfasser diesen Fall, um die Aufmerksamkeit der Ärzte auf die Möglichkeit des Vorkommens anderer ähnlicher Fälle in unserem Lande zu lenken.

## ON A CASE OF *LARVA MIGRANS-VISCERALIS*

SUMMARY

The authors report a case of *larva migrans-visceralis (myiasis reptans visceralis* or toxocariasis) occurring in a human subject as a consequence of accidental ingestion of the eggs of *Toxocara canis*. After batching in the intestine the larvae followed an atypical migratory cycle in the human subject which is an unatural host, and settled down in the right masseter muscle where they induced multiple granulomatosis with a pseudo-tumoral aspect.

In histopathological sections of the material collected during operation, the authors detected a nematode larva in the centre of each granulome. According to the structural details as described in the speciality literature, these larvae were identified as belonging to the species *Toxocara canis*.

Since this disease has been but recently described as a morbid entity (1952), the authors report the present case in order to draw the attention of physicians to the possible existence of other similar cases in Roumania.

# CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE DES CHEVAUX

## NOTE I. ÉVOLUTION DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES SANGUINES ET VALEUR DIAGNOSTIQUE DU MYÉLOGRAMME

par

M. Iliesco, St. Berceanu et C. Coure

*(Travail effectué sous la direction du prof. A. P. Ciucă dans l'Institut „Dr. I. Cantacuzino" Service d'Hématologie-Sérologie.)*

— Manuscrit reçu le 20 novembre 1959 —

Dans une étude antérieure, on a exposé une partie des résultats obtenus à la suite des recherches expérimentales concernant l'anémie infectieuse des chevaux (2). Les observations effectuées ont conduit à la constatation que seule l'étude systématique des modifications des organes hémato-formateurs et celle de la mœlle osseuse en particulier, pourra permettre quelque progrès dans l'étude de cette infection; le matériel qui a servi à ces recherches provenait d'animaux morts ou sacrifiés à la suite de cette infection; la méthode employée a été celle des empreintes.

La présente note résume les résultats des recherches effectuées en ce qui concerne les modifications morphologiques du sang et les modifications de la mœlle osseuse pendant les différentes phases évolutives, présentées par les animaux infectés expérimentalement.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences ont été effectuées sur 6 poulains de 8 à 10 mois, en parfaite santé, provenant d'une région indemne d'anémie infectieuse. Pour faciliter les déterminations, ils ont été répartis en deux groupes, chaque cheval étant inoculé avec le virus de l'anémie infectieuse et étudié du point de vue clinique, hématologique et sérologique, avant et après l'infection expérimentale. Les animaux ont été observés pendant une période suffisamment longue (26 jours le premier lot, 70 jours le second).

Pendant la période d'observation précédant l'inoculation, les animaux ont été soumis à plusieurs examens cliniques et de laboratoire, à fin d'exclure la possibilité d'autres maladies propres aux chevaux, telles les infections parasitaires et l'hémosporidiose. De même, on a effectué 4 examens hématologiques et un examen médullaire pour chaque animal.

Après l'inoculation, on a continué les examens pendant la période d'incubation, ainsi que pendant la maladie, leur nombre variant d'un animal à l'autre, en rapport avec la durée de l'incubation (tableaux I et II et tableau résumatif).

L'infection a été réalisée par la voie intraveineuse à la dose de 20 ml sérum sanguin provenant d'une anémie infectieuse (matérial gracieusement mis à notre disposition par le Dr. C. Surdan, de la Chaire de Maladies contagieuses de la Faculté de Médecine Vétérinaire), filtré par Seitz $EK_2$ et contrôlé du point de vue bactériologique à fin d'exclure une infection secondaire. Les animaux du lot I ont présenté une forme légère de maladie, avec un seul accès fébrile, approximativement 10 à 15 jours après l'inoculation et déglobulisation modérée ou nulle. Le lot II a présenté une forme grave de maladie avec 3 à 5 accès fébriles, état général fortement altéré et déglobulisation accentuée.

## TECHNIQUE

1. Le sang périphérique employé pour les déterminations a été récolté par ponction de la veine jugulaire.

2. La mœlle osseuse a été prélevée par ponction osseuse de l'ilion dans la dépression qui se forme au-dessus des tubérosités inférieures de l'angle extérieur de l'ilion. On a renoncé à pratiquer la ponction sternale, vu les difficultés d'exécution chez le cheval, ainsi que la ponction de la côte, très mobile, qui n'offre pas un bon matériel d'étude. La ponction de l'ilion à l'angle extérieur, présente l'avantage de ne pas exposer l'animal à un risque quelconque, elle est facile à exécuter et peut être répétée.

A la suite des ponctions répétées, on a observé une induration locale qui déforme la région, mais n'empêche pas le prélèvement de la mœlle. Nous avons effectué sur les deux groupes (6 poulains) en tout 113 ponctions osseuses, sans rencontrer d'inconvénients.

La ponction de l'ilion a été faite à l'aide d'un trocart, long de 10 cm, à diamètre de 2 mm, suffisamment résistant, en employant la technique suivante:

On épile toute la région de l'angle extérieur de l'ilion, on la badigeonne à la teinture d'iode, on introduit le trocart en vrille dans la direction avant arrière, horizontalement et un peu obliquement dans la direction de la colonne vertébrale de l'animal jusqu'à la sensation de vide (environ 2—3 cm de profondeur). On enlève la tige du trocart, on adapte une seringue de 20 ml, parfaitement étanche et on aspire avec force 2—3 fois.

Le contenu de la seringue — la mœlle — d'aspect graisseux, semifluide, de couleur rouge-foncé, est déposé sur un verre de montre; ensuite on procède à la préparation des frottis.

Tous les frottis — mœlle et sang périphérique — ont été colorés au May-Grünwald-Giemsa.

## RÉSULTATS

I. *Sang périphérique.* Les modifications sanguines ont été étudiées sur un total de 126 hémogrammes, comme suit: avant l'inoculation par 4 hémogrammes pour chaque animal du groupe I et un hémogramme pour chaque cheval du groupe II; après inoculation, 18 hémogrammes pour chaque poulain du lot I et 19 pour chaque animal du lot II.

Nos recherches concernant les modifications de nombre et de réaction morphologique des élements figurés (tableau résumatif) ont démontré des troubles quasi-pareils à ceux décrits dans une note antérieure (2). Nous n'insisterons

ci que sur quelques aspects, que nous considérons plus caractéristiques, ou ur ceux qui diffèrent des modifications observées dans l'étude précédente.

1. *Les hématies* présentent des variations de nombre, avec baisse impor- ante dans les cas de maladies graves, à accès fébriles répétés. Ainsi, les animaux u groupe II ont présenté des baisses, allant de 6.400.000 jusqu'à 2.140.000, u même 1.680.000 (cheval no. 6).

Les animaux du groupe I, qui ont fait une maladie cliniquement inappa- ente, montrant des lésions peu prononcées à la ponction hépatique et au con- rôle nécropsique, ont présenté une baisse modérée et passagère du nombre es hématies.

La morphologie du globule rouge ne montre pas de modifications impor- ntes pouvant donner des indications sur la présence de l'anémie infectieuse t seulement de rares formes d'anisocytose à macro- et microcytes et assez fré- uente apparition d'érythroblastes.

2. *Les leucocytes* présentent de très grandes variations de nombre, tant endant la période d'observation, qu'après l'inoculation.

3. *La formule leucocytaire.* Les lymphocytes, généralement en grand nombre, tteignent parfois 60—70% pendant l'accès fébrile.

Les granulocytes chez les animaux indemnes, dépassent, en général, le ourcentage des lymphocytes, continuant à prédominer pendant la maladie.

On observe constamment des formes plus jeunes (métamyélocytes) sans gnification importante.

Les modifications toxiques dans le cytoplasme et dans le noyau sont fré- uentes, mais non caractéristiques. Néanmois, il faut tenir compte des modi- cations présentées par des éléments cellulaires sanguins d'origine réticulo- istiocytaire, survenues au cours de la maladie; pendant la période normale, es éléments représentés seulement par des monocytes typiques (2—4—8%), euvent atteindre au cours de la maladie le taux de 15—20—30% (Tableau I). )ans certains cas, leur nombre varie pendant la maladie dans les limites ormales pour une courte période et commence ultérieurement à augmenter our atteindre finalement 20—30%.

Le polymorphisme de ces éléments pendant la maladie présente une grande nportance, telle l'apparition des cellules réticulaires, jeunes, non-différenciées ig. 1) et des cellules en voie de différenciation: cellules réticulaires lymphoïdes, éticulaires plasmocytoïdes, plasmocytes et monocytes.

A remarquer, que les animaux avec une forme légère (groupe I) ont pré- nté une réaction périphérique modérée, aussi bien du point de vue nombre, ue polymorphisme.

II. *Moelle osseuse.* La ponction médullaire, effectuée selon la technique écrite, nous a fourni un matériel assez riche qui a permis l'étude et les obser- ations des modifications pathologiques.

On a pratiqué une ponction médullaire à chaque animal avant l'inocula- on; pendant la période d'incubation et de maladie: 8 ponctions pour chaque nimal du groupe I et 10 ponctions pour ceux du groupe II. La période d'incu- ation variant d'un animal à l'autre, chez une partie des animaux, la plupart es myélogrammes ont été effectués pendant cette période, tandis que chez majorité des animaux — à incubation courte — les plus nombreux myélo- rammes ont été faits dans la période de maladie (animaux 2, 4, 5, 6) (Tableau II).

*Tableau I*

**Myélogrammes du lot I des animaux, en résumé (pourcentages calculés à % éléments blancs)**

| Cheval | Eléments | Ponction | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 *) | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| I | H—M | 9 | 3 | 18 | 30 | 24 | 22 | 13 | 23 |
| | Gr. N. | 34 | 33 | 52 | 14 | 56 | 43 | 63 | 60 |
| | Lymph. | 50 | 64 | 30 | 56 | 20 | 35 | 24 | 17 |
| | Eb. | 52 | 30 | 51 | 4 | 0 | 2 | | 30 |
| II | H—M. | 10 | 11 | 33 | 32 | | 23 | 6 | 10 |
| | Gr. N. | 28 | 52 | 64 | 22 | | 70 | 25 | 40 |
| | Lymph. | 5 | 37 | 3 | 56 | | 20 | 69 | 20 |
| | Eb. | 57 | 40 | 132 | | | 3 | 3 | 127 |
| III | H—M. | 10 | 16 | 7 | 13 | 31 | 20 | 15 | 22 |
| | Gr. N. | 20 | 90 | 56 | 58 | 62 | 57 | 74 | 49 |
| | Lymph. | 3 | 4 | 35 | 29 | 7 | 22 | 11 | 28 |
| | Eb. | 76 | 167 | 125 | 12 | 187 | 46 | 185 | 90 |

Légende: H—M. = éléments histio-monocytaires; Gr. N.: granulocytes neutrophiles.
Lymph. = lymphocytes; Eb. = érythroblastes
Observations: *) Moment de l'infection des animaux; apparition des premiers symptômes de maladie clinique
Premier myélogramme chez les chevaux I, II et III, fait avant l'inoculation (myélogramme normal)

*Tableau II*

**Myélogrammes du lot II des animaux, en résumé (pourcentages calculés à % éléments blancs)**

| Cheval | Eléments | Ponction | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 *) | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| IV | H—M. | 8 | 19 | 22 | 21 | 23 | 35 | 19 | 38 | 17 | 35 | 16 |
| | Gr. N. | 45 | 56 | 51 | 55 | 78 | 54 | 73 | 43 | 57 | 51 | 75 |
| | Lymph. | 47 | 25 | 10 | 24 | 7 | 11 | 9 | 11 | 25 | 12 | 9 |
| | Eb. | 48 | 88 | 176 | 124 | 65 | 67 | 260 | 91 | 148 | 84 | 133 |
| V | H—M. | 5 | 9 | 11 | 22 | 26 | 27 | 22 | 16 | 27 | 21 | 18 |
| | Gr. N. | 66 | 42 | 57 | 72 | 57 | 65 | 72 | 72 | 57 | 46 | 76 |
| | Lymph. | 29 | 49 | 35 | 6 | 12 | 8 | 7 | 12 | 16 | 33 | 4 |
| | Eb. | 27 | 6 | | 230 | 164 | 56 | 119 | 143 | 175 | 55 | 163 |
| VI | H—M. | 8 | 12 | 17 | 13 | 13 | 16 | 20 | 24 | 33 | 18 | |
| | Gr. N. | 77 | 34 | 57 | 42 | 35 | 28 | 54 | 53 | 77 | 36 | |
| | Lymph. | 15 | 54 | 26 | 45 | 52 | 56 | 26 | 23 | 30 | 46 | |
| | Eb. | 288 | 35 | 164 | 38 | 41 | 24 | 129 | 100 | 111 | 2 | |

Légende: H—M. = éléments histio-monocytaires; Gr.N.: granulocytes neutrophiles.
Lymph. = lymphocytes; Eb. = érythroblastes
*) Moment de l'infection des animaux; apparition des premiers symptômes de maladie clinique
Premier myélogramme chez les chevaux I, II et III, fait avant l'inoculation (myélogramme normal).

On a constaté chez le groupe I (maladie quasi-inapparente): une augmentation limitée des cellules réticulaires, un polymorphisme peu accentué et absence des éléments à caractère blastique non-différencié.

Le groupe II (maladie grave) présente:

— mœlle osseuse normale: éléments myéloïdes prédominants, à l'exception d'un cas avec prédominance des érythroblastes;

— myélogrammes effectuées pendant la maladie:

a) *série érythroblastique*: augmentation importante, rarement on a constaté des baisses;

b) *série myéloïde*: sans modifications importantes. Les rapports des éléments d'âges différents présentent les mêmes caractères que ceux de la période normale, avec prédominance des éléments adultes. Un seul cheval a présenté un nombre plus élevé de myélocytes et pro-myélocytes;

c) *série réticulo-histio-monocytaire*: présente des modifications plus importantes et plus caractéristiques, avec augmentations importantes de ces éléments (33—38% éléments nucléés) pendant la période d'incubation et surtout celle de la maladie; en moyenne ils sont doubles pendant l'incubation et quadruples pendant la maladie.

Ce que nous considérons plus important dans cette série se sont les modifications qualitatives, extrêmement caractéristiques au cours de la maladie.

Ainsi, des deux myélogrammes (chevaux 4 et 5) présentés „in extenso" dans le tableau III, on constate le polymorphisme très accentué des éléments réticu-

*Tableau III*

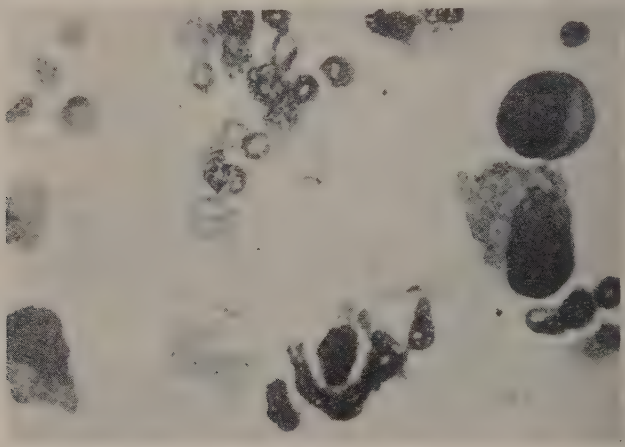
**Myélogrammes des chevaux IV et V pendant la période de santé et en pleine maladie**

| Eléments | Cheval IV | | | | Cheval V | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | période de santé | | période de maladie | | période de santé | | période de maladie | |
| Myéloblastes | 1 | | 4 | | 1 | | 1 | |
| Promyélocytes | 1 | | 4 | | 2 | | | |
| Myélocytes | 2 | | 3 | | 2 | | 2 | |
| Méta-myélocytes | 10 | 100 | 14 | 100 | 10 | 100 | 5 | 100 |
| Stab.-Kg. | 35 | | 25 | | 23 | | 57 | |
| Segmentés N. | 46 | | 43 | | 58 | | 5 | |
| » E. | 3 | | 7 | | 4 | | | |
| » B. | 2 | | | | | | | |
| Lymphocytes | 67 | 67 | 42 | 42 | 34 | | 109 | |
| Monocytes | 5 | | 10 | | 1 | | 2 | |
| Cell. rét. lymphoides | 2 | | 17 | | 0 | | 42 | |
| » » monocytes | 1 | | 12 | | 1 | | 10 | |
| » » plasmatiques | 0 | 8 | 12 | 82 | 1 | 5 | 4 | 79 |
| Plasmocytes | 0 | | 6 | | 0 | | 0 | |
| Cellules réticulaires | 0 | | 21 | | 2 | | 18 | |
| Hémocytoblastes | 0 | | 4 | | 0 | | 3 | |
| Pro-érythroblastes | 3 | | 24 | | 1 | | 2 | |
| Erythroblastes basophiles | 2 | 73 | 23 | 168 | 4 | 11 | 3 | 24 |
| » polychromatophiles | 34 | | 47 | | 4 | | 13 | |
| » ortochromatophiles | 34 | | 74 | | 2 | | 6 | |

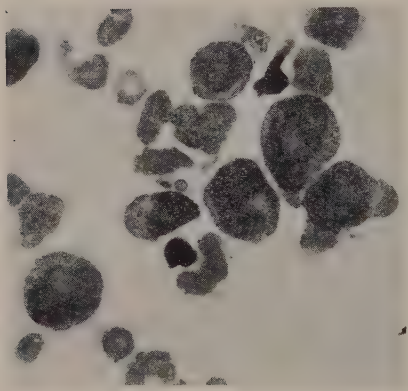
Les myélogrammes ont été calculés en rapportant toutes les séries à 100 éléments myéloïdes.

laires et des formes de passage peu différenciées, conduisant à une classification parfois arbitraire des éléments.

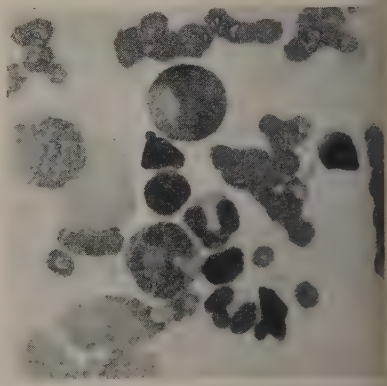
Les éléments blastiques jeunes présentent des caractères morphologiques particulièrement variés: les uns avec aspect de cellule réticulaire jeune (photo 1), les autres à caractères évidents d'hémocytoblaste et d'autres encore paraissent



*Photographie 1.* Ponction médullaire — cellules réticulaires jeunes



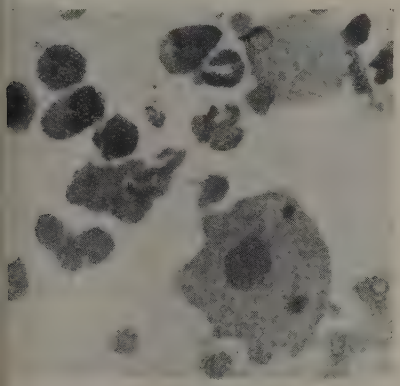
*Photographie 2.* Ponction médullaire — cellules réticulaires à aspect blastique



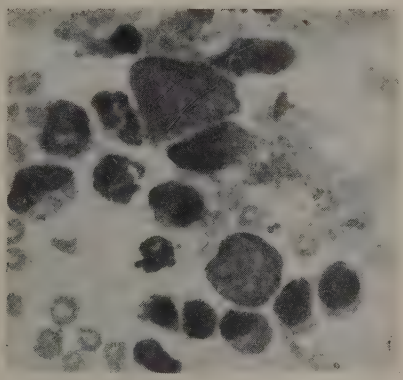
*Photographie 3.* Ponction médullaire — cellules réticulaires à aspect monocytoïde

être des formes de transition vers les séries hématopoïétiques ou vers les formes différentielles des cellules réticulaires. Ainsi, on observe des types de blastes avec aspect vague de myéloblastes (photo 2), de monoblastes ou de plasmoblastes.

En dehors des éléments réticulaires à caractère blastique, on observe aussi les formes de transition avec aspect de cellule réticulaire lymphoïde, de cellule réticulaire monocytoïde (photo 3) ou plasmocytoïde (photo 4).



*Photographie 4.* Ponction médullaire — cellules réticulaires à aspect plasmocytoïde



*Photographie 5.* Ponction médullaire — hyperplasie réticulaire polymorphe avec certaines cellules à caractère malin

Chez tous ces types cellulaires on remarque aussi des anomalies morphologiques, avec développement asynchrone nucléo-cytoplasmatique, avec des bourgeons nucléaires ou même fragmentation. On trouve également des formes géantes à caractère tumoral (photo 5).

De même, nous signalons la présence des altérations à caractère toxique: vacuolisation dans le noyau et le cytoplasme, apparition de troubles tinctoriaux, fragmentations nucléaires.

## DISCUSSION

Nos études actuelles poursuivant pour la première fois les modifications du sang périphérique et de la mœlle osseuse, parallèlement à l'évolution de la maladie clinique, il reste à savoir quels sont les apports de cette méthode au problème de l'anémie infectieuse en général et dans quelle mesure ces données peuvent être utilisées comme méthodes de diagnostic.

Il est nécessaire de souligner que les données obtenues dans les conditions mentionnées ne peuvent avoir une valeur absolue; ce n'est que par l'étude approfondie du tableau du myélogramme du jeune cheval par bio-ponctions répétées sur un nombre élevé d'animaux, qu'elles pourraient présenter une valeur plus importante.

Nos recherches sur le cheval normal sont insuffisantes, vu qu'on n'a pratiqué qu'une seule ponction médullaire; les myélogrammes effectués au début de la période d'incubation pourraient montrer un aspect médullaire normal.

I. Il est à remarquer que la mœlle osseuse de l'animal jeune, présente les caractères suivants:

1. *Une lymphocytose accrue*, de même que pour le sang périphérique, mais très variable, pouvant atteindre les pourcentages des éléments myéloïdes.

2. *La série myéloïde* dépasse généralement en pourcentage les autres séries; elle est représentée surtout par des éléments adultes ou presque adultes.

3. *La série érythroblastique*, est bien représentée, atteignant de grands pourcentages, avec prédominance des éléments évolués poly- et orthochromatophiles et nombreux éléments jeunes basophiles.

4. *La série réticulo-histio-monocytaire* est pauvre du point de vue nombre; qualitativement, elle est représentée par quelques éléments monocytaires ou lympho-réticulaires.

5. *La série mégacaryocytaire* est représentée par des mégacaryocytes d'âge et formes variés.

II. *Le myélogramme de la période de maladie*, présente quelques modifications importantes, surtout d'ordre qualitatif.

Des résultats exposés il ressort que la série granulocytaire et lymphocytaire, tout comme dans le sang périphérique, ne présente pas de modifications caractéristiques. Nous n'insisterons pas sur la série érythroblastique, vu qu'on n'a pu établir un tableau précis du myélogramme normal. Néanmoins, on a observé une augmentation du pourcentage des érythroblastes pendant la période de maladie, spécialement chez le groupe 2, augmentation que nous apprécions comme significative.

La modification la plus importante du myélogramme pendant la maladie consiste dans la réaction hyperplasique du système réticulo-histiocytaire, avec des conséquences surtout pour le sang périphérique. Ce fait a été montré aussi dans notre travail précédent où on a insisté sur le système réticulo-histiocytaire de tous les organes.

Analysant les myélogrammes, surtout ceux donnés « in extenso », on remarque l'augmentation évidente du nombre des cellules réticulo-histiomonocytaires, atteignant pour les myélogrammes effectués un pourcentage des éléments myéloïdes jusqu'à 78%. Ces réactions réticulo-endothéliales dans la mœlle sont accompagnées des augmentations respectives dans le sang périphérique, les éléments du même type atteignant jusqu'à 16—20% en moyenne. De même, en comparaison avec les leucogrammes et myélogrammes normaux, l'augmentation est évidente et caractéristique. A remarquer, que certains myélogrammes, même pendant la maladie, ne présentent pas ces augmentations, cette absence de réaction étant toutefois sporadique.

A part l'augmentation numérique globale des éléments réticulo-histiomonocytaires, on observe une modification d'ordre qualitatif, que nous considérons plus importante; on rencontre toutes les formes possibles de cellules réticulaires, déviées vers les formes cytologiques plus mûres, de type inflammatoire (monocytes, histiocytes, plasmocytes, etc.). Sans revenir sur les considérations concernant les particularités morphologiques, nous insisterons particulièrement sur la nécessité de l'étude morphologique de ces formes polymorphes de cellules réticulaires, que nous considérons très importantes pour le diagnostic hématologique de l'anémie infectieuse.

*Quelle est la valeur diagnostique du myélogramme et quelle est son importance pour l'étude de la pathogénie de la maladie ?*

Dans notre première étude sur la pathogénie (2), la réaction accentuée, parfois métaplasique du système réticulo-endothélial, nous a conduit à l'hypothèse l'un rapprochement entre l'anémie infectieuse et les maladies de système du ype des leucoses et réticuloses. Nous considérons en ce cas, que l'anémie paraît être surtout de type arégénératif, ainsi qu'on le remarque dans les hyperplasies umorales du système réticulo-endothélial.

Toutefois, les données de la présente étude concernant les modifications le la mœlle osseuse, observées du point de vue dynamique, nous obligent à faire certaines réserves. Il est clair que la maladie a comme base une réaction ntense du système réticulo-endothélial, mais elle paraît être une réaction hyperplasique toxi-infectieuse et non une métaplasie à caractère tumoral leucosique. En effet, nos recherches actuelles montrent que l'hématopoïèse, dans sa composonence myéloïde et érythroblastique, se déroule normalement, même pendant es stades les plus avancés de la maladie, indifféremment de l'intensité des réactions du système réticulo-endothélial. D'ailleurs, ces réactions si marquées soient-elles, n'arrivent pas à dépasser en intensité la myélo- et l'érythropoïèse, a dernière étant très accentuée, ce qui prouve l'existence d'un processus régénératif, probablement compensateur des processus d'hémolyse périphérique. Donc, selon nous, l'étude systématique du myélogramme serait la plus ndiquée pour l'éclaircissement des problèmes de pathogénie dans l'anémie nfectieuse.

Ainsi que nous l'avons déjà dit, nous supposons que la maladie est une réticulose secondaire à l'infection virotique, qui dans la mœlle n'atteint pas l'intensité des réticuloses primitives et des leucoses menant à la destruction de l'hématopoïèse.

Le système érythroblastique est fortement réactif avec hyperplasie riche de toutes les cellules, indifféremment de l'âge, mais surtout des formes adultes, ce qui indique une régénération soutenue d'hématies.

Selon nous, l'étude de la mœlle osseuse, par la technique de la médullo-ponction pourrait représenter avec beaucoup de probabilité une méthode de diagnostic. Nous ne pouvons encore faire des affirmations quant à sa valeur pathognomonique, comme dans le cas de la bio-ponction hépatique, mais, étant donné la facilité d'exécution et le fait qu'on peut la répéter, nous considérons qu'elle offre des données suffisantes, qui en corroboration avec la suspicion clinique et les réactions histiomonocytaires périphériques, peuvent devenir une méthode de diagnostic. Nous insistons sur la nécessité de sa répétition et surtout sur celle de distinguer le polymorphisme de la réaction du système réticuloendothélial, polymorphisme que nous considérons comme l'élément le plus important pour le diagnostic morphologique sanguin.

RÉSUMÉ

Afin d'établir une méthode plus sûre de diagnostic de l'anémie infectieuse des chevaux, on a inoculé 6 poulains — répartis en deux groupes.

Le prélèvement du matériel d'étude a été effectué:

— du sang périphérique (veine jugulaire)

— de la mœlle osseuse — os iliaque — considérée par nous comme étant la plus adéquate pour les recherches.

Bien que tous les animaux aient été inoculés avec la même souche et la même quantité de virus, une partie ont fait une forme sévère et d'autres une maladie cliniquement inapparente, avec lésions peu prononcées.

En général, nous avons constaté que les modifications importantes survenues au cours de la maladie sont présentées par les éléments cellulaires sanguins et médullaires d'origine réticulo-histiocytaire, qui augmentent sensiblement (jusqu'à 20–30% dans le sang périphérique et à 68—78% dans la mœlle).

Un élément important est représenté par le polymorphisme de ces cellules; on a observé des cellules réticulaires jeunes, non-différenciées et des cellules en voie de différenciation, des cellules réticulaires lymphoïdes, monocytoïdes, plasmocytaires, histiocytaires.

En conclusion, nous considérons que l'étude systématique, particulièrement celle de la mœlle osseuse, offre des données suffisantes qui, en corroboration avec la suspicion clinique, peuvent devenir une méthode indispensable de diagnostic.

TABLEAU RÉSUMATIF

**manifestations cliniques et modifications sanguines périphériques chez les animaux**

| Cheval No. | Forme clinique de maladie | Variations limites du nombre d'hématies | | Variations limites des pourcentages des éléments histiomonocytaires | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | avant l'inoculation | après l'inoculation | avant l'inoculation | après l'inoculation |
| I | Forme quasi-inapparente un seul accès fébrile | 6,1 mill. — 7 mill. | 5—6,8 mill. | 5—10 | 6—21 |
| II | Idem | 5,7—6,8 mill. | 3,8—5,6 mill. | 3—15 | 3—27 |
| III | Idem | 7—10 mill. | 6—6,7 mill. | 2—8 | 5—18 |
| IV | Forme de gravité moyenne avec 6 accès fébriles | 6,7 mill. | 3—6 mill. | 6 | 10—30 |
| V | Forme idem, moyenne, avec 4 accès fébriles isolés | 6,4 mill. | 3,2—5,1 mill. | 4 | 4—19 |
| VI | Forme grave avec 5 accès fébriles | 6,4 mill. | 1,8—5,3 mill. | 3 | 5—22 |

*Observations*

Aux trois derniers animaux on a fait une seule détermination avant l'inoculation

BIBLIOGRAPHIE

. Kalinin A.S. — Sbornik Neucinih Trudov, 1952, **3,** 175 et 1955, **5,** 160
. Iliesco M., Berceanu S., Dâmboviceanu A., Maximesco P., Papazian E., Lescinski S. et Istrati M. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1958, **17,** 187.
. Ivanov V.P. — Biul. nauk. Tehniceskoi inform., 1957, no. 1, 30.
. Koleakov I.E. — L'anémie infectieuse des chevaux, Medghiz, Moscou, 1940.
. Muratov S.I. — Serhozghiz, Moscou, 1954.
. Zulinski T. — Ann. Sc. agronomiques, 1956, **67,** série E. Med. Vét. cat. 3 Varsovie

## ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КРОВИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ

### I. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ МИЭЛОГРАММЫ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В целях установления более надежного способа диагносцирования инфекционной анемии лошадей, проведено экспериментальное заражение 6 жеребцов, разделенных в 2 серии
Материал для исследования брали из:
— Периферийной крови из яремной вены
— Костного мозга из тазовой кости, которую мы считаем наиболее подходящей для данного исследования.
Хотя все животные были заражены тем же штаммом и количеством вируса, некоторые животные заболели тяжелой формой, в то время как у других болезнь была клинически заметной, однако с мало выраженными поражениями.
В общем из проведенных исследований следует, что в течении болезни изменения, на которые необходимо обратить внимание, касаются кровяных и костномозговых элеметов ретикулогистиоцитарного происхождения.
Процент данных клеток резко возрастает, так что в периферийной крови они достигают до 20—30%, а в костном мозгу 68—78%.
Большое значение имеет полиморфизм данных клеток. Могут появляться молодые недифференцированные ретикулярные клетки и дифференцирующиеся клетки; лимфоидные моноцитоидные и плазмоцитарные ретикулярные клетки, гистиоциты.
В заключении мы считаем, что систематическое изучение особенно костного мозга приносит данные, причем сопоставление этих данных с клиническими подозрениями показывает необходимость данного способа для диагностики.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN VERLAUF DER MORPHOLOGISCHEN BLUTVERÄNDERUNGEN IN DER INFEKTIÖSEN PFERDEANÄMIE

### I. DER DIAGNOSTISCHE WERT DES MYELOGRAMMS.

ZUSAMMENFASSUNG

Um ein sicheres Verfahren zur Diagnostizierung der infektiösen Pferdeanämie auszuarbeiten, wurden 6 (in zwei Gruppen eingeteilte) Fohlen experimentell infiziert.
Das Untersuchungsmaterial wurde folgendermassen gewonnen:
— Periphäres Blut, aus der V. jugularis.
— Knochenmark, aus dem Hüftknochen, der für diese Art von Untersuchung am geeignetesten schien.
Obgleich alle Tiere mit der gleichen Menge des gleichen Virusstammes infiziert wurden, trat bei einigen eine schwere Krankheitsform und bei anderen eine subklinische Erkrankung, mit schwach ausgeprägten Schäden auf.
Im allgemeinen, ergab sich aus den durchgeführten Untersuchungen, dass die bedeutendsten Veränderungen im Verlauf der Krankheit die Zellen retikulohistiozytären Ursprungs im Blut und im Knochenmark betreffen.
Der Prozentualanteil dieser Zellen steigt stark an, und zwar bis zu 20—30% im periphären Blut und bis zu 68—78% im Knochenmark.

Von grosser Bedeutung ist der Polymorphismus dieser Zellen. Es können junge, undifferenzierte Zellen und Zellen, bei welchen die Differenzierung eingesetzt hat auftreten (lymphoïde und monozytoïde Retikulumzellen, Plasmazellen, Histiozyten).

Abschliessend glauben wir, dass die systematische Untersuchung, insbesondere des Knochenmarks, gestützt durch den klinischen Verdacht, genügende Anhaltspunkte bietet, um eine unentbehrliche Methode der Diagnose zu werden.

## INVESTIGATIONS CONCERNING THE COURSE OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BLOOD OF HORSES SUFFERING FROM INFECTIOUS ANAEMIA.

### I. THE DIAGNOSTIC VALUE OF THE MYELOGRAM.

SUMMARY

In order to devise a reliable method for the diagnosis of infectious anaemia of horses, 6 foals (divided into 2 groups) were experimentally inoculated with the virus.

The material to be investigated was collected as follows:

— Blood, from the jugular vein.

— Bone marrow, from the iliac bone which may be considered as the most adequate source in this type of investigation.

Although all animals had been inoculated with the same strain and amount of virus, some of them displayed a severe disease while others exhibited but slight clinical signs and inconspicuous lesions.

On the whole, from the determinations performed, the main changes to be taken into account during the disease were found to concern the cells of reticulohistiocytic origin in the blood and bone marrow.

Their incidence rate increases considerably, attaining 20—30 per cent in the peripheral blood and 68—70 per cent in the bone marrow.

The polymorphism of these cells is an element of particular importance. Young and undifferentiated reticulum cells may be present as well as cells under way of differentiation, such as lymphoid or monocytoid reticulum cells, plasma cells, and histiocytes.

In conclusion, the authors feel that a systematic study of the bone marrow in particular, when corroborated by a clinical suspicion, affords sufficient data to become an indispensable method of diagnosis.

# CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE DES CHEVAUX

## NOTE II. LA PONCTION HÉPATIQUE DANS L'ANÉMIE INFECTIEUSE DES CHEVAUX. SA VALEUR POUR LE DIAGNOSTIC ET L'ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DES LÉSIONS

par

M. Iliesco, St. Berceanu et C. Coure

*Travail effectué sous la direction du prof. A.P. Ciucă dans l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service d'Hématologie-sérologie en collaboration avec la Chaire de Maladies infectieuses de la Faculté de Médecine Vétérinaire)*

— Manuscrit reçu le 20 novembre 1959 —

Dans une communication antérieure (3) nous avons exposé nos recherches concernant les modifications de la morphologie sanguine dans l'anémie infectieuse des chevaux.

L'étude de cette maladie, dont le diagnostic clinique et de laboratoire se trouve encore dans un stade peu avancé, a été continuée aussi dans d'autres directions. Reprenant des recherches antérieures (4) on a poursuivi « intra vitam », certaines méthodes d'exploration, afin de nous arrêter à celle qui peut nous offrir la meilleure voie pour le diagnostic. Par analogie avec les explorations qui s'effectuent dans la pathologie humaine du système réticulo-endothélial (Sre), nous avons pratiqué des bioponctions répétées dans les organes avec une concentration maximum de Sre: mœlle osseuse, foie et rate.

On expose dans la note présente la technique, les résultats et les conclusions sur la bioponction hépatique. Les résultats obtenus ont été vérifiés par observations sur le matériel anatomique récolté à la nécropsie des animaux, effectuée à la fin des expériences) et se trouvent synthétisés à la fin de la note.

### MATÉRIEL ET MÉTHODE.

L'étude a été faite sur 6 jeunes chevaux, les mêmes que ceux utilisés pour les recherches précédentes, où on a décrit la méthode d'infection des animaux et les examens morphologiques et médullaires, pratiqués avant et après l'inoculation (3). A part les examens hématologiques et médullaires, on a fait des bioponctions dans le foie, pendant la période précédant l'inoculation.

Les bioponctions hépatiques ont été effectuées selon le schéma suivant:

*Lot I* (forme légère de maladie):

1-e ponction en pleine santé;

2-e ponction pendant la période d'incubation;

3-e ponction, pour le cheval No. 2 au début de l'accès fébrile et pour les deux autres 3 à 7 jours avant le premier accès.

4-e et 6-e ponction après l'accès fébrile en pleine maladie.

*Lot II* (animaux à forme fébrile grave):

1-e ponction en pleine santé;

2-e ponction pendant la période d'incubation;

4-e, 5-e, 6-e, 7-e et 8-e ponction après le premier accès fébrile en pleine maladie (chez le cheval No 5, la 3-e ponction a été faite le jour du premier accès fébrile).

*Technique de la ponction hépatique.* Matériel nécessaire: une aiguille-trocart spéciale, longue de 25 cm avec la marge de la canule libre, finement dentellée et tranchante, un bistouri, de la teinture d'iode, une seringue de 20 ml, parfaitement étanche, une boîte Pétri avec sérum physiologique.

La ponction se fait de préférence dans le 14-e espace intercostal, au niveau de la ligne parallèle à la colonne vertébrale qui passe par l'angle extérieur de l'ilion.

Après avoir fait la boutonnière à l'aide du bistouri, on introduit l'aiguille (canule + mandrin) en avant et en dedans dans la direction de l'olécrâne de la jambe opposée. Après introduction de 15 cm on retire le trocart en y enfonçant la canule en vrille encore de 1,5—2 cm. Le contenu est versé dans la boîte Pétri. On tamponne l'incision, on masse la région de la ponction à l'aide d'une compresse et on procède au pansement. La matériel récolté par ponction consiste d'un fragment, de forme plus ou moins cylindrique, généralement d'une longueur de 1,5 cm. La fragmentation possible de ce matériel, ne gêne ni la préparation, ni la lecture des coupes.

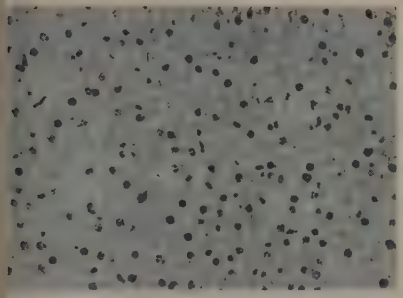
Pour la fixation on a utilisé la solution ZENKER, pendant 3—4 heures; ensuite on a procédé à l'inclusion des petits fragments en paraffine, selon la technique usuelle. Afin d'éviter la fragmentation du matériel, il est préférable d'exécuter toutes les opérations jusqu'à l'inclusion, dans un seul récipient, en changeant les ingrédients. Les sections de 4—5 microns sont colorées à l'hématoxyline-éosine VAN GIESON et GIEMSA.

## RÉSULTATS

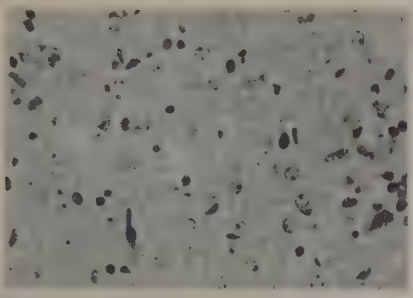
L'examen des sections de tissu hépatique, récolté des 6 animaux par ponctions répétées, montre, en premier lieu, une différence évidente en ce qui concerne l'intensité et la spécificité des lésions présentées par le lot I, par rapport à celles du lot II.

On a déjà mentionné que le lot I, a fait, tant du point de vue clinique qu'hématologique, une maladie peu caractéristique, sans présenter les manifestations graves, bien connues. Ce fait a été confirmé aussi par l'examen anatomo-pathologique, effectué à la nécropsie des animaux sacrifiés après 50—55 jours d'observation.

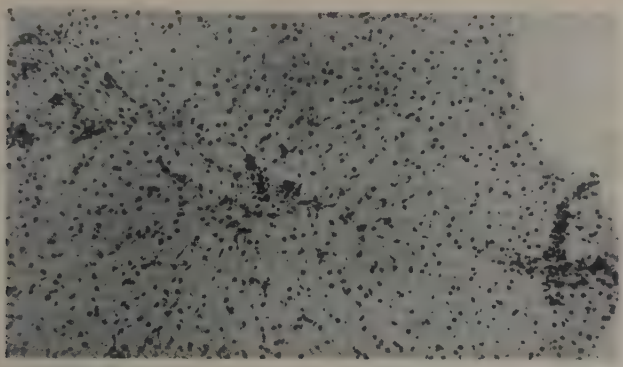
La maladie caractéristique du lot II a été confirmée cliniquement, du point de vue hématologique, ainsi qu'à l'examen anatomo-pathologique par nécropsie. Etant donné que les lésions présentées à la biopsie hépatique par les animaux du lot II sont de beaucoup plus caractéristiques, nous exposons en premier lieu les résultats obtenus sur ce groupe.



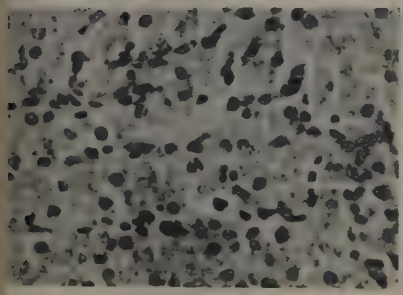
*Photographie 1.* — Ponction II (période d'incubation). Aspect de foie normal



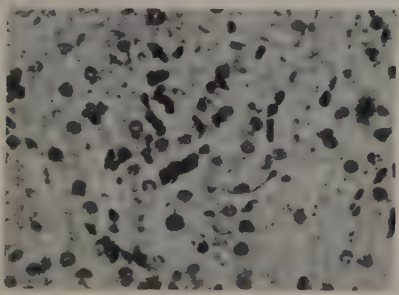
*Photographie 2.* — Ponction III — Début de réaction interstitielle: Oedème et hyperplasie dans les cellules Kupffer



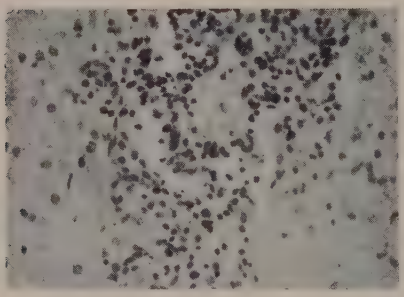
*Photographie 3.* — Ponction V — Infiltration diffuse, infiltration dans les nodules circonscrits dans le septe porte



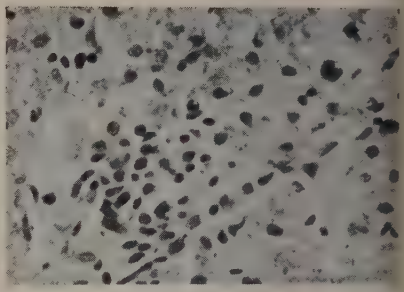
*Photographie 4.* — Ponction V — Infiltration intense avec de grandes cellules



*Photographie 5.* — Ponction VI — Hyperplasie accentuée de l'appareil Kupfferien



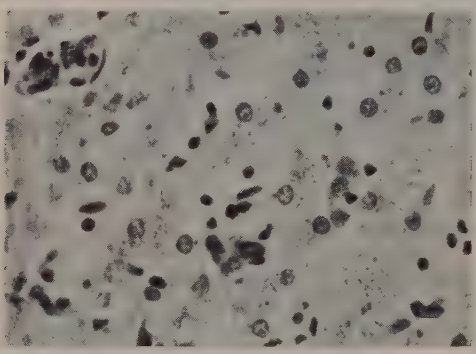
*Photographie 6.* — Ponction VI — Infiltration lympho-réticulaire dans le septe porte



*Photographie 7.* — Ponction VI — Nodule intra-lobulaire et lymphoréticulaire, dissociant les travées hépatiques

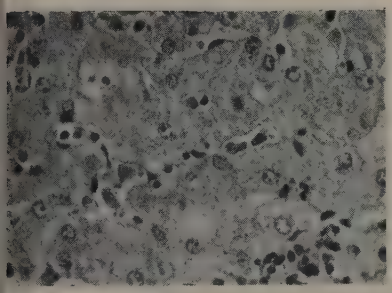
*Première et seconde ponction* (période de santé et d'incubation): tissu hépatique normal avec dessin lobulaire évident, sans altération parenchymateuse ni réaction interstitielle. On n'observe pas de différences entre les tissus des chevaux (Photo. 1).

*Troisième ponction*: modifications évidentes, mais encore non-caractéristiques (surtout chez le cheval No. 6): œdème et congestion modérée intertrabéculaire avec réaction hyperplasique dans les endothéliums sinusiens et dans les cellules Kupffer. En plus, présence de petites infiltrations d'éléments histiolymphomonocytaires prédominant surtout dans les espaces portes. Les cellules hépatiques paraissent plus actives, avec des noyaux très évidents, gonflés et présentant vers le pôle biliaire et en général autour du noyau, un pigment biliaire très fin (Photo. 2).

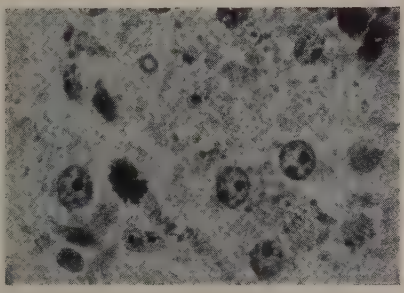


*Photographie 8.* — Ponction VII — Cellules Kupffer avec aspect géant par érythro et pigmentophagie.

*Quatrième ponction* (effectuée en plein état infectieux): lésions évidentes chez les 3 animaux, en phase aiguë: réaction hyperplasique intense des endothéliums sinusiens, y compris les cellules Kupffer, pouvant se mobiliser et former des traînées et petits nodules intertrabéculaires. En plus, présence de nodules caractéristiques dans les espaces portes et autour des veines centro-lobulaires. Pigment biliaire plus accentué dans les cellules hépatiques. Le pigment ferrique ainsi que tout autre symptôme d'érythro-ou de pigmentophagie sont absents. Espaces intertrabéculaires dilatés et parfois remplis d'hématies.



*Photographie 9.* — Ponction VIII — Ery-hro-phagie accentuée dans les cellules Kupffer



*Photographie 10.* — Ponction VIII — Mitose dans les cellules Kupffer

*Cinquième ponction*: maximum de réaction hyperplasique et infiltration éticulo-histiocytaire et monocytaire, disposée de manière diffuse et dense ainsi ue sous forme de nodules intra-lobulaires, dans les espaces portes (Photo. 3). tructure réticulaire avec grands éléments cellulaires, très caractéristiques et istincts, surtout chez les chevaux 5 et 6 (Photo. 4).

Le cheval 6 présente des lésions dégénératives dans les cellules hépatiques; dème et stase centro-lobulaire intenses, comprimant les travées hépatiques. On ne remarque pas d'aspects érythro- et pigmentophagiques.

*Sixième ponction*: hyperplasie réticulaire générale, tous les éléments endo-hélio-réticulaires étant mobilisés et présentant des formes variées de différen-iation vers les cellules histio-monocytaires et macrophages actifs. Cellules Kupf-er très abondantes, grandes et détachées en partie. Apparition de l'érythro-t pigmentophagie, toutefois modérée (chevaux nos. 4 et 5) (Photo. 5). Sinus rges, paraissant obstrués par les infiltrations réticulaires. Travées hépatiques mincies, avec cellules disloquées et lésions dégénératives. Le cheval no. 5 résente dans les espaces portes des nodules très grands et compacts (Photo 6) t le cheval No. 4 un aspect syncytial d'hyperplasie réticulaire, avec filia-on évidente des éléments (Photo. 7.)

*Septième ponction*: les mêmes réactions hyperplasiques et infiltratives, avec rythrophagie et surtout pigmentophagie intense; par la pigmentophagie les ellules prennent des aspects géants, surtout chez les chevaux nos. 5 et 6 (photo 8).

*Huitième ponction*: les lésions évoluent sur le même plan que les précéden-es; l'hyperplasie géante des cellules endothéliales et des cellules Kupffer se emarque de façon caractéristique. Pigmento- et érythrophagie abondantes; on bserve des cellules Kupffer avec 2 à 3 hématies. On constate également la résence de syncytium chez le cheval no. 4 (Photo. 9). Dans les sinus on bserve des cellules réticulaires en mytose (Photo. 10). L'érythrophagie atteint on maximum et dépasse la pigmentophagie (cheval no 6).

L'apparition et l'évolution des lésions chez les chevaux du lot I, observées ur les 6 ponctions effectuées, sont beaucoup plus atténuées, étant donné que es animaux ont fait une forme légère de maladie. La première ponction montre, ans ce cas aussi, un parenchyme normal. Les modifications pathologiques

apparaissent dès la seconde ponction chez le cheval no. 2; on constate également une hyperplasie réticulo-endothéliale modérée. A la 3-e ponction cette réaction chez le cheval no. 2 devient encore plus évidente, étant disposée sous forme de petits nodules, bien circonscrits. Chez les chevaux nos. 1 et 3 les lésions sont encore discrètes, même à la 4-e ponction; à la 5-e elles sont assez évidentes et prennent, chez tous les 3 animaux, à peu près le même aspect: réaction hyperplasique et infiltrative, généralement diffuse et circonscrite. La 6-e ponction ne révèle aucune modification évolutive importante. Les lésions sont caractéristiques en tant qu'infiltration interstitielle; dans tous les cas on observe l'absence de l'érythro- et pigmentophagie, ainsi que la dégénérescence cellulaire hépatique.

*Examen histo-pathologique général après nécropsie.* Les lésions constatées sont du même ordre que celles décrites dans notre étude antérieure (3). On a observé des variations quant à l'intensité d'un animal à l'autre, et surtout entre le lot I et le lot II. Nous soulignons quelques éléments histo-pathologiques spéciaux:

*Lot I*: lésions hépatiques (les mêmes que dans les ponctions 5 et 6) diffuses et qualitativement caractéristiques, d'intensité modérée; riche pigment libre des sinus (chevaux 1 et 2); absence de lésions dégénératives; pigmento- et très rare érythrophagie parcellaire (cheval no. 1); infiltrations interstitielles fréquentes dans les reins, dépassant celle du foie, surtout chez les chevaux 1 et 2; lésions glomérulaires inconstantes et plutôt parcellaires; lésions habituelles dans la rate avec hyperplasie des follicules lymphatiques et métaplasie réticulaire modérée; métaplasie évidente dans la pulpe rouge avec stase hématique accentuée, pigment riche, la pigmentophagie n'a été observée que chez le cheval no 3, l'érythrophagie étant absente.

Nous insistons sur la présence des lésions infiltratives interstitielles du myocarde, caractéristiques chez les 3 animaux; les lésions dégénératives des fibres du myocarde sont rares et modérées.

*Lot II*: lésions très accentuées, diffuses dans tous les organes. A part l'élément infiltratif et hyperplasique, on observe des lésions exsudatives avec œdème interstitiel, surtout dans le foie, la rate, le myocarde et les reins. A remarquer les lésions dégénératives et nécrosantes dans les cellules parenchymateuses (foie, reins, myocarde), qui sont presque totalement absentes chez les animaux du lot I. L'érythro- et la pigmentophagie sont présentes dans le foie et la rate. La mœlle osseuse, examinée sur sections, présente une hyperplasie réticulo-endothéliale générale; le parenchyme médullaire hématopoïétique non-altéré.

## DISCUSSION

On a établi, dans des travaux antérieurs, la nature réticulo-endothéliale virotique de l'anémie infectieuse des chevaux. Dans notre étude (3) nous avons insisté, par des arguments morphologiques, hématologiques (et par analogie avec la pathologie des leucoses et des réticuloses de l'homme), sur la nécessité de considérer l'anémie infectieuse comme une réticulose de nature virotique, pouvant évoluer de manière aiguë ou chronique. De même, nous avons insisté sur la physio-pathologie générale et surtout sur le symptôme principal de l'anémie et le syndrome hémorragique.

Nous avons affirmé alors, que l'unique moyen pour avancer dans l'étude
e la pathogénie et de la physio-pathologie de l'anémie infectieuse, ainsi que
e trouver un moyen sûr de diagnostic, serait celui d'appliquer à l'étude de
tte affection les méthodes d'investigations utilisées sur une large échelle pour
importe quelle hémopathie de l'homme: exploration des organes de hémato-
oïèse et en général des organes réticulo-endothéliaux (mœlle, foie, rate). C'est
e ce point de vue qu'il faut considérer les bioponctions effectuées par nous,
ans la maladie expérimentale. Le matériel obtenu par bioponctions hépatiques
pétées a rendu possible pour la première fois l'observation des lésions sur un
ême animal, étudiant ainsi leur apparition et développement progressif jusqu'à
phase d'intensité maxima. Il ressort clairement que les modifications
imaires consistent dans l'irritation et l'hyperplasie de l'appareil cellulaire
ticulo-endothélial autochtone, qui se mobilise dans les sinus et s'agglomère
e manière diffuse sous forme de nodules. On peut observer les stades de dévelop-
ement des nodules et la filiation des éléments cellulaires infiltratifs provenant
e la cellule réticulaire ou endothélio-sinusienne — spécialisée ou non, telle
cellule Kupffer. L'état clinique, l'aspect général et la gravité de la maladie,
nsi que les manifestations hématologiques périphériques, sont intimement
és à cette irritation hyperplasique et infiltrative du système réticulo-endothélial.
e lot I d'animaux fait une maladie clinique et hématologique modérée; la réac-
on du système réticulo-endothélial du foie est également modérée, ainsi que
ont montré les examens anatomo-pathologiques sur les pièces de nécropsie.

Les animaux du lot II font une maladie à évolution aiguë, avec poussées
briles répétées et déglobulisation massive, qui mène à l'anémie accentuée;
ponction hépatique démontre dans ce cas une réaction réticulo-endothéliale
récoce et progressive, avec lésions infiltratives importantes, en même temps
ue des lésions dégénératives, secondaires dans les cellules hépatiques.

Nous attirons l'attention sur le fait que les modifications histopathologiques,
ropres au processus d'hémolyse, n'apparaissent pas chez les animaux du lot I
naladie atténuée minime), se manifestant plus tard — à partir de la 5-e ponc-
on — chez les chevaux du second lot. Ces constatations, possibles seulement
ar la ponction hépatique, confirment l'hypothèse émise dans nos travaux anté-
eurs, c'est-à-dire que l'anémie hémolytique est un phénomène secondaire,
vec apparition tardive, due probablement aux perturbations humorales et
rganiques, étroitement liées à l'irritation et à l'hyperplasie du système réticulo-
ndothélial. L'évolution des lésions, observée par la bioponction hépatique,
rouve assez clairement que l'anémie hémolytique ne représente, en tout cas
as le trouble initial, pouvant être absente dans certaines formes, bien que la
naladie existe en tant qu'affection du système réticulo-endothélial (Lot I).
'absence des lésions hémolytiques dans toutes les ponctions effectuées sur le
t I, leur apparition tardive, s'accentuant seulement au dernier stade de la mala-
ie, chez le lot II, a été rendue évidente par le matériel présenté.

## CONCLUSIONS

Parmi les moyens de diagnostic dans l'anémie infectieuse des chevaux, la
onction hépatique s'impose comme méthode qui fournit des données patho-
nomoniques. Jusqu'à présent elle apparaît comme la seule possibilité permet-

tant d'observer l'apparition et l'évolution des lésions dans l'organe d'élection, respectivement le foie.

Étant donné la nature diffuse des lésions dans cet organe, on peut exclure l'éventualité d'une ponction dans une zone parenchymateuse indemne. De même, l'innocuité de la méthode et la possibilité d'effectuer des recherches sur l'organe le plus caractéristique, nous font considérer que la bioponction est la seule méthode indiquée pour le diagnostic de l'anémie infectieuse.

Son application doit dépasser le stade des recherches et elle peut être pratiquée dans la clinique vétérinaire, offrant un moyen rapide et sûr de diagnostic, qui peut remplacer toutes les autres méthodes peu sûres, laborieuses et coûteuses, utilisées jusqu'à présent.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cerneak V.Z. et Kojnov D.I. — Leningrad, Selhozghiz, 1951, 4-e éd, No. 130
2. Hütten H. et Wilkens H. — Berl. u. Münch. Tier. Wschrft., 1957, No. 9.
3. Iliesco M., Berceanu G. et Coure C. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1960, **19.**
4. Luckin I.B. et Semenov V.V. — Veterinaria, 1939. No. 6. 29.
5. Nicolesco Al. et Giurgiu T. — Anuar Inst. Patol. Ig. Anim. 1951—1952. **3,** 73.
6. Rojkov G.I. — L'anémie infectieuse du cheval. Moscou, 1949.
7. Rojkov G.I. — Veterinaria, 1950. No. 8. 1015.

## ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КРОВИ

### II. ПУНКТАТ ПЕЧЕНИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ. ЗНАЧЕНИЕ ЭТОГО СПОСОБА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В поисках надежного способа диагностики вызвали экспериментальную инфекционную анемию у двух групп животных состоящих каждая из трех молодых лошадей, путем внутривенного введения фильтрированной сыворотки от больного инфекционной анемией животного.

Все животные проявили клинические и гематологические признаки заболевания, однако в одной группе болезнь протекала в стертой форме с легкой анемией.

У всех животных проводили гематологические исследования и пунктаты печени, шестикратно в первой группе и 8- кратно во II -ой группе.

Гистопатологическое исследование материала пунктатов показывает появление изменений и их динамику от первых признаков раздражения ретикуло-эндотелиальной системы до грануломатозной инфильтрации и дегенеративных изменений. Вскрытие животных подтверждает результаты, полученные при исследовании материала пунктатов.

Приходят к заключению, что пунктат печени является единственным способом, выявляющим гистопатогенез изменений, проявляющихся постепенно в виде вирусного заболевания ретикуло-эндотелиальной системы и лишь вторичным образом и в поздних сроках в виде гемолитической анемии. Пункцая печени является единственным специфическим способом для диагностики инфекционной анемии, который целесообразно применять в качестве очередного способа диагностики в ветеринарной клинике.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN VERLAUF DER MORPHOLOGISCHEN BLUTVERÄNDERUNGEN IN DER INFEKTIÖSEN PFERDEANÄMIE

### II. DIE LEBERPUNKTION IN DER INFEKTIÖSEN PFERDEANÄMIE; IHR WERT IN DER DIAGNOSE UND IM STUDIUM DER ENTWICKLUNG DER SCHÄDIGUNGEN.

ZUSAMMENFASSUNG.

Um eine sichere Methode der Diagnose zu finden, wurde bei zwei Gruppen von je drei jungen Pferden eine infektiöse Anämie, durch intravenöse Einspritzung eines filtrierten Serums von kranken Tieren experimentell hervorgerufen.

Alle Tiere wiesen eine klinische und hämatologische Erkrankung auf, doch verlief e Krankheit bei einer Gruppe leicht und mit nur geringfügiger Anämie.

Alle Tiere wurden fortlaufend hämatologisch untersucht und bei allen wurden Leber- ınktionen vorgenommen, im ganzen 6 mal bei der ersten und 8 mal bei der zweiten Gruppe.

Die histopathologische Untersuchung des Punktionsmaterials zeigt das Auftreten der chäden und die Dynamik ihrer Entwicklung, von den ersten Anzeichen einer Reizung des E-Systems, bis zur granulomatösen Infiltration und zur Ausbildung von degenerativen chäden. Die Nekropsie der Tiere bestätigte die Ergebnisse der Leberpunktionen.

Daraus wird geschlossen, dass die Leberpunktion das einzige Verfahren ist, um die istopathogenese der Schäden und ihren zeitlichen Verlauf aufzudecken, insofern es sich m eine Viruserkrankung des RES handelt, die sich erst sekundär und spät als hämoly- sche Anämie äussert. Daher ergeben sich nur aus der Leberpunktion pathognomonische nzeichen der infektiösen Pferdeanämie und dieses Verfahren muss unter die laufenden agnostischen Methoden der tierärztlichen Klinik aufgenommen werden.

## NVESTIGATIONS CONCERNING THE COURSE OF MORPHOLOGICAL CHAN- ES IN THE BLOOD OF HORSES SUFFERING FROM INFECTIOUS ANAEMIA

### NEEDLE-BIOPSY OF THE LIVER IN INFECTIOUS ANAEMIA OF HORSES: ITS VALUE IN DIAG- NOSIS AND FOR THE STUDY OF THE DEVELOPMENT OF THE LESIONS.

SUMMARY

In order to devise a reliable method of diagnosis, infectious anaemia was experimen- lly induced in two groups of three young horses each, by the intravenous inoculation of ltered serum collected from animals suffering from the disease.

All the animals displayed clinical and haematological signs of the desease which, howe- r, in one group assumed a very attenuated course with slight anaemia.

Haematological determinations were performed in all animals. A total of 6 or 8 needle- opsies of the liver were carried out in the first and second group respectively.

Histopathological examination of the material collected by needle-biopsy reveals the ppearance of the lesions as well as the dynamics of their evolution from the first signs irritation of the R.E. system up to granulomatous infiltration and degenerative changes. ost-mortem examination of the animals confirmed the results obtained by needle-biopsy the liver.

Needle biopsy of the liver appears to be the sole method revealing the histopathogenesis the lesions which develop in time as a viral disease of the R.E.S. and only secondarily nd at a later moment as a haemolytic anaemia. It may be inferred that needle-biopsy of the ver is the sole method yielding pathognomonic signs for the diagnosis of infectious anaemia nd should consequently become a current means of investigation in the veterinary clinic.

# ONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE L'ACTION PATHOGÈNE EXPÉ-IMENTALE DES *BACILLES PARATUBERCULEUX*, ISOLÉS DE L'EAU ET DE LA BOUE DU LAC NOIR DE SOVATA [1])

par

C. Bonciu, Olga Bonciu, Monica Petrovici et R. Demetresco

*Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service d'Anatomie Pathologique et de l'Institut de Balnéologie et de Physiothérapie — Service de Microbiologie).*

— Manuscrit reçu le 16 juin 1959 —

Les *bacilles paratuberculeux* manifestent, en général, une action pathogène duite sur les animaux homéothermes de laboratoire (lapin, cobaye, souris, t), qui varie selon l'espèce et même dans le cadre d'une même espèce, selon nimal et la voie d'introduction des germes utilisés.

Inoculés par voie souscutanée, les *bacilles paratuberculeux* provoquent, bituellement, des abcès locaux avec guérison spontanée et, dans certains cas, ême des lésions généralisées, plus ou moins prononcées, à évolution lente prolongée, guérissant parfois spontanément. L'infection évolue rarement rs la mort.

L'inoculation par voie intrapéritonéale est plus nocive, produisant souvent mort par lésions péritonéales et généralisation.

L'infection intraveineuse détermine la mort dans une plus grande pro-ortion, à cause des lésions généralisées; la voie intracérébrale donne le plus and nombre de cas mortels.

Par l'association des suspensions microbiennes avec différentes substances, raisse, huile de paraffine, soufre, cire, savon, talc, kaolin, etc.) indépendamment de manière d'inoculer, (suspension de germes et substance séparément ou en élange) les *bacilles paratuberculeux* — généralement non-pathogènes — peuvent oduire des lésions, les bacilles pathogènes donnant souvent des lésions plus aves à évolution rapide, situées au niveau du poumon (lésions importantes, crotiques), du foie et de la rate, (lésions moins importantes) et un pourcentage us élevé de mortalité. Par contre, en cas d'inoculation avec une suspension ire, les lésions importantes sont localisées dans le foie et la rate; les lésions lmonaires sont moins importantes.

On a obtenu des lésions aussi avec des bacilles tués, surtout par voie intra-rébrale. Ces lésions à aspect toxique (endotoxine) sont dégénératives, infil-atives et hémorragiques.

[1]) Lac salé héliothermique, situé en Roumanie (Transylvanie).

Du point de vue histologique, les lésions provoquées par les *bacilles paratuberculeux* peuvent être classées:

1. lésions caractéristiques, ressemblant à celles produites par le bacille Koch, à tendance plus prononcée vers une transformation purulente;

2. lésions non-caractéristiques, dégénératives, infiltratives et hémorragiques.

Chez l'homme, on trouve (Laporte (5)) des lésions provoquées par les *bacilles paratuberculeux*: abcès souscutané, éruption pustuleuse de la peau, spléno-pneumonies avec pleurésie, etc. Ces lésions se rencontrent surtout chez les nouveaux-nés, les enfants en bas âge et chez les adultes peu résistants.

La pathogénité des *bacilles paratuberculeux* pour les animaux à sang froid (grenouille, poisson, colimaçon) est moins bien connue. En général, on a réussi à provoquer une dissémination des lésions et parfois même la mort de l'animal (les auteurs ne fournissent que peu de données macroscopiques ou microscopiques). Galli Valero et Hauduroy (3,4) ont obtenu par injections souscutanées ou dans la cavité cœlomique des lésions généralisées. D'autres auteurs ont décrit seulement les lésions macroscopiques: granulations ou petits tubercules localisés sur le mésentère (Martmann) ou généralisés (Moeller) (cités par Hauduroy).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a utilisé 15 espèces de *Mycobactéries paratuberculeuses*: *chelonei*, *pellegrini*, *phlei*, *ranae*, *rabinowitschi*, *grassbergeri*, *graminis*, *grassbacillus*, *smegmatis*, *thamnopheos*, *crotin*, *butyricum*, *friburgensis*, *piscis* et une espèce non-identifiée *(species)*. Ces germes ont été isolés, au cours de l'examen bactériologique, de l'eau et de la boue d'un lac salé héliothermique (Lac Noir de Sovata)[1].

Comme animaux d'expérience, nous nous sommes servis de: cobayes (130), souris (270), grenouilles (130) et dans quelques cas de rats (20).

Les bacilles ont été inoculés par voie sous-cutanée (sac lymphatique) et intrapéritonéale, rarement intraveineuse (cultures fraîches de 24 heures sur gélose, suspendues dans du sérum physiologique). La quantité de bacilles a varié suivant l'animal et la voie d'administration:

— cobayes: voie sous-cutanée — 1 tube[2] (1 tube, 18/18); voie intrapéritonéale — 1/2 tube; intraveineuse 1/5 tube;

— rats: voie souscutanée — 1/2 tube; voie intrapéritonéale — 1/4 tube; voie intraveineuse — 1/5 tube;

— souris: voie souscutanée — 1/2 tube; voie intrapéritonéale — 1/4 tube; voie intraveineuse — 1/5 tube;

— grenouilles: voie souscutanée — 1/2 tube; voie intracœlomique — 1/4 tubes.

En même temps que l'inoculation des bacilles, on a fait parfois des injections sous-cutanées d'huile de paraffine, dans une autre région du corps, en quantités variables: (pour les cobayes, rats et grenouilles — 1 cmc et pour la souris 0,5 cmc).

---

[1]) Contribution à l'étude des bacilles paratuberculeux isolés de l'eau et de la boue des lacs thérapeutiques, par O. Bonciu, V. Dumitresco et Dogaru I. — Communication présentée à la Session Scientifique de l'Institut de Balnéologie et de Physiothérapie, Bucarest, mars 1956 et à la Société des Sciences Médicales, Bucarest mars 1956.

[2]) un tube de culture abondamment développée suspendu dans 4—5 ml sol. NaCl 0,85% contient environ 0,1 poids humide.

On a pratiqué des sections dans tous les organes, cerveau compris, des animaux morts ou sacrifiés à différents intervalles, poursuivant surtout les lésions caractéristiques (granulomes). Les lésions infiltratives, dégénératives et hémorragiques ont été également étudiées, tenant compte du fait que des lésions semblables peuvent se rencontrer chez les animaux de laboratoire à sang chaud apparemment normaux et que chez les grenouilles elles peuvent être déterminées par des parasites. Les grenouilles utilisées ont présenté des parasites dans la peau et organes, en proportion de 70%, comme suit: poumons 25%, reins 4%, cavité cœlomique 33%, peau 25%, estomac 10%, cœur et foie 5% et plus rarement dans les ovaires, rate, utérus, surrénales.

Une grande partie des cas a été examinée bactériologiquement par frottis directs et cultures des différents organes (rate, foie, poumon).

## RÉSULTATS

Nous relatons les résultats obtenus dans les expériences effectuées avec les 15 espèces de *Mycobactéries paratuberculeuses*, en suspension microbienne pure (sérum physiologique) et associée à l'huile de paraffine, inoculées simultanément dans deux régions différentes.

### I. MYCOBACTERIUM PELLEGRINI

A. *Cobayes: a)* Inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 14—28 jours): petits nodules à mononucléaires et cellules épithélioïdes dans les ganglions, rate et cerveau.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (morts ou sacrifiés à 12—24 jours): petits nodules de mononucléaires, cellules épithélioïdes, polynucléaires et fibroblastes dans la rate, foie et péritoine;

*c)* inoculation intraveineuse:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 14—21 jours): petits nodules à mononucléaires et cellules épithélioïdes.

B. *Rats: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 12—20 jours): pas de lésions caractéristiques;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiés à 10—20 jours): pas de lésions caractéristiques;

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiés à 12—20 jours): petits nodules de mononucléaires, cellules épithélioïdes et polynucléaires dans la rate et les ganglions;

*c)* inoculation intraveineuse:

1) avec suspension microbienne pure ou associée (sacrifiés à 10—20 jours): pas de lésions caractéristiques.

C. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 30—90 jours): pas de lésions caractéristiques;

2) avec suspension microbienne associée (mortes ou sacrifiées à 13—93 jours): petits nodules de mononucléaires et cellules épithélioïdes dans la rate et le foie;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 30—90 jours): pas de lésions caractéristiques;

2) avec suspension microbienne associée (mortes ou sacrifiées à 8—93 jours): petits nodules de mononucléaires et cellules épithélioïdes dans la rate et le foie;

*c)* inoculation intraveineuse:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes ou sacrifiées à 20—30 jours) petits nodules de mononucléaires et cellules épithélioïdes dans la rate et le foie.

D. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 30—63 jours): pas de lésions anatomo-pathologiques.

*b)* inoculation dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure (mortes à 32 jours): cœlomite, alvéolite albumino-leucocytaire et rate septique;

2) avec suspension microbienne associée (mortes à 8 jours): cœlomite, alvéolite albumino-leucocytaire et rate septique; (rate septique = forte congestion, uniformisation avec disparition des follicules, disparition du pigment jaune-brun normal et parfois hyperplasie réticulo-endothéliale, hémorragie, zones avec restes cellulaires et fréquents polynucléaires).

## II. MYCOBACTERIUM PHLEI

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 20—90 jours): petits nodules de mononucléaires et cellules épithélioïdes, dans la rate.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (morts ou sacrifiés à 20—30 jours): petits nodules de mononucléaires et cellules épithélioïdes dans: la rate, foie, poumon, pancréas, ganglions et péritoine;

*c)* inoculation intraveineuse:

1) avec suspension microbienne pure et associée (morts ou sacrifiés à 10—20 jours): pas de lésions caractéristiques.

B. *Rats: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—20 jours): petits nodules de mononucléaires et cellules épithélioïdes dans les ganglions et le foie.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—20 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes et mononucléaires dans la rate, péritoine, épiploon, mésentère.

*c)* inoculation intraveineuse:

1 avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—20 jours) pas de lésions caractéristiques.

C. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 10—20—90 jours): pas de lésions caractéristiques;

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiées à 20—30—90—140 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires et fibroblastes dans la rate, foie et reins.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 10—20—90 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires et fibroblastes dans la rate, foie, cœur et péritoine;

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiées à 20—90 jours): petits nodules de mononucléaires, cellules épithélioïdes et fibroblastes dans: la rate, foie, péritoine, reins, poumons, cœur et méninges.

*c)* inoculation intraveineuse:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes ou sacrifiées à 10—20 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes et mononucléaires dans: la rate, foie et méninges.

D. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 9—20 jours): rate septique;

*b)* inoculation dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 10—15 jours): cœlomite, rate septique, hépatite, glomérulo-néphrite.

## III. MYCOBACTERIUM CHELONEI

A. *Cobayes: a)* inoculation sous cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiés à 15—16 jours): petits nodules de mononucléaires et cellules épithélioïdes dans le foie; (sacrifiés à 35 jours): pas de lésions caractéristiques;

2) avec suspension microbienne associée, (sacrifiés à 15 et 22 jours): petits nodules de llules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires et fibroblastes dans la rate et le foie; crifiés à 120 jours: pas de lésions caractéristiques.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure (morts ou sacrifiés à 10—34 jours): petits nodus de cellules épithélioïdes, mononucléaires et polynucléaires dans la rate, foie, ganglions, sticules et péritoine;

2) avec suspension microbienne associée (morts ou sacrifiés à 11—34 jours): nodules cellules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires, fibroblastes, cellules géantes, nécros et abcès dans la rate, foie, poumons, ganglions, pancréas, péritoine et méninges.

*c)* inoculation intraveineuse:

1) avec suspension microbienne pure et associée (morts à 7—34 jours): petits nodules cellules épithélioïdes, mononucléaires, cellules géantes, fibroblastes et petits abcès dans rate, poumons, ganglions et reins.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 34—144 jours): petits nodules de llules épithélioïdes et mononucléaires dans la rate et le foie:

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiées à 20—144 jours): petits nodules cellules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires, cellules géantes et fibroblastes dans foie, rate, reins, poumons, myocarde, surrénales et méninges.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure: sacrifiées à 34 jours, petits nodules de cellules ithélioïdes et mononucléaires dans la rate et le foie; sacrifiées à 95 et 144 jours: pas de sions caractéristiques.

2) avec suspension microbienne associée: petits nodules de cellules épithélioïdes, monoucléaires, polynucléaires, cellules géantes, fibroblastes et petits abcès dans la rate, foie, pouons, reins, surrénales, testicules, ganglions, méninges et péritoine.

*c)* inoculation intraveineuse:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes ou sacrifiées à 4—20 jours): etits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires et polynucléaires dans la rate, foie, ins, surrénales, poumons et épicarde.

D. *Grenouilles: a)* inoculation sous cutanée

1) avec suspension microbienne pure ou associée (mortes à 4—10 jours): rate septique hémorragie pulmonaire.

*b)* inoculation dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure et associée: cœlomite, alvéolite exsudativo-émorragique;

2) avec suspension microbienne associée on consta'e en plus des petits nodules formés e cellules épithélioïdes, leucocytes, fibroblastes, cellules géantes multinuclées, avec au entre des nodules, de fréquents bacilles acido-alcoolo-résistants dans les poumons, foie épicarde.

## IV. MYCOBACTERIUM RANAE

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiés à 20—40 jours): pas de lésions caracristiques;

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiés à 20 -100 jours): petits nodules de llules épithélioïdes et mononucléaires dans la rate.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiés à 40—60 jours): pas de lésions caracristiques;

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiés à 30 -40 jours): petits nodules de llules épithélioïdes et mononucléaires dans les follicules spléniques.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 30 -120 jours): pas de lésions caracristiques;

2) avec suspension microbienne associée: sacrifiées à 30 jours: petits nodules de cellus épithélioïdes et mononucléaires dans les ganglions et le foie; sacrifiées à 100 jours: pas e lésions caractéristiques;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 30—90 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes et mononucléaires dans la rate, foie et reins.

C. *Grenouilles: a)* inoculation sous cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée: pas de lésions;

*b)* inoculation dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure (mortes à 32 jours): cœlomite, rate septique et alvéolite albumino-leucocytaire;

2) avec suspension microbienne associée (mortes à 8 jours): cœlomite, rate septique et alvéolite albumino-leucocytaire.

### V. MYCOBACTERIUM RABINOWITCHI

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—40—120 jours): pas de lésions caractéristiques;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 20—40 jours): pas de lésions caractéristiques;

*c)* inoculation intraveineuse:

1) avec suspension microbienne pure ou associée (sacrifiés à 40—80 jours): pas de lésions caractéristiques.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure ou associée (sacrifiées à 40—90—140 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires et fibroblastes dans: la rate, foie, méninges et reins;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 40—90 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes et mononucléaires dans: la rate, foie et méninges.

C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 24—40 jours): pas de lésions;

2) avec suspension microbienne associée (mortes à 20—45 jours): rate septique, alvéolite albumino-leucocytaire et petits nodules de cellules épithélioïdes, leucocytes et fibroblastes, avec, au centre, amas de bacilles acido-alcoolo-résistants dans: le foie, reins et poumons;

*b)* inoculation dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 16—20 jours): rate septique, alvéolite albumino-leucocytaire hémorragique, glomérulo-néphrite, cœlomite.

### VI. MYCOBACTERIUM GRASSBERGERI

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—32 jours): pas de lésions caractéristiques;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—32 jours): pas de lésions caractéristiques. Un seul cobaye, inoculé avec suspension associée, sacrifié à 32 jours, a présenté dans la rate un nodule de cellules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires et fibroblastes avec, au centre du nodule, de fréquents bacilles acido-alcoolo-résistants.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 20—60 jours): pas de lésions caractéristiques;

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiées à 20—60 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires et polynucléaires dans le foie et les reins;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure (mortes à 5—10 jours): lésions de péritonite avec petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires et petits abcès;

2) avec suspension microbienne associée (mortes à 4—12 jours): lésions de péritonite, nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires, fibroblastes et petits abcès disséminés dans le foie, rate et péritoine; zone de nécrose dans le péritoine.

C. *Grenouilles a)* inoculation sous-cutanée et dans la cavité cœlomique:
1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 14—21 jours): lésions de: élomite, rate septique, hépatite et alvéolite albumino-leucocytaire.

VII. MYCOBACTERIUM GRAMINIS

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—30 jours): pas de sions caractéristiques.
B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:
1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 10—30 jours): pas de lésions caractéristiques;
2) avec suspension microbienne associée (sacrifiées à 10 —30 jours): petits nodules de ellules épithélioïdes et mononucléaires dans les follicules spléniques et surrénales; broblastes (un seul cas).
*b)* inoculation intrapéritonéale:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 10—20 jours): petits nodules e cellules épithélioïdes et mononucléaires dans les follicules spléniques et les surrénales; broblastes (un seul cas).
C. *Grenouilles: a)* inoculation sous cutanée et dans la cavité cœlomique:
1) avec suspension microbienne pure ou associée (mortes à 15—20 jours): lésions de: élomite, rate septique et hémorragie pulmonaire.

VIII. MYCOBACTERIUM GRASSBACILLUS

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—30 jours): pas de lésions ractéristiques.
B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 10—30 jours): pas de sions caractéristiques.
C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée et dans la cavité cœlomique:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 10—30 jours): pas e lésions.

IX. MYCOBACTERIUM SMEGMATIS

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—30 jours): pas de sions caractéristiques.
B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 10—30 jours): pas de sions caractéristiques.
C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 10—30 jours): pas e lésions;
b) inoculation dans la cavité cœlomique:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées ou mortes à 9—30 jours): te septique, cœlomite et hépatite.

X. MYCOBACTERIUM THAMNOPHEOS

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:
1) avec suspension bactérienne pure et associée (sacrifiés à 10—30 jours): pas de sions caractéristiques.
B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:
1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 10—30 jours): pas de sions caractéristiques;
*b)* inoculation intrapéritonéale:
1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 10—30—60 jours): petits nodules e cellules épithélioïdes, mononucléaires et fibroblastes dans le foie et péritoine;

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiées à 10—30—60 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires et fibroblastes dans la: rate, foie et péritoine.

C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée et dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 8—20 jours): lésions de: cœlomite, rate septique et hémorragie pulmonaire.

XI. MYCOBACTERIUM CROTIN

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—30 jours): pas de lésions caractéristiques.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 15—30 jours): pas de lésions caractéristiques.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 15—30 jours): petits nodules de cellules épithélioïdes et mononucléaires dans les follicules spléniques; lésions observées aussi dans les reins en cas d'association.

C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée et dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure (mortes à 8—20 jours): rate septique, cœlomite, alvéolite fibrino-leucocytaire, hépatite;

2) avec suspension microbienne associée (mortes à 8—10 jours): mêmes lésions et en plus, petits nodules de leucocytes et cellules épithélioïdes dans le foie avec, dans le centre des nodules, des masses de bacilles acido-alcoolo-résistants.

XII. MYCOBACTERIUM BUTYRICUM

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 10—30 jours): pas de lésions caractéristiques à l'exception d'un seul cas d'inoculation associée: petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires et fibroblastes dans la rate.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 10—30 jours): pas de lésions caractéristiques; sacrifiées à 60 jours: petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires et fibroblastes dans la rate et le foie;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 10—30—60 jours): pas de lésions caractéristiques.

C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée et dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 10—50 jours): rate septique, cœlomite et dans un cas péricardite fibrineuse; les grenouilles sacrifiées à 10—50 jours n'ont pas présenté de lésions.

XIII. MYCOBACTERIUM FRIBURGENSIS

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiés à 35—100 jours): pas de lésions caractéristiques;

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiés à 35—100 jours): pas de lésions caractéristiques à l'exception d'un seul cas sacrifié à 35 jours: petits nodules de cellules épithélioïdes et mononucléaires dans le foie et la rate.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 35—100 jours): pas de lésions caractéristiques.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure (sacrifiées à 35—95 jours): pas de lésions caractéristiques.

2) avec suspension microbienne associée (sacrifiées à 35—95 jours): pas de lésions caractéristiques à l'exception d'un cas sacrifié à 45 jours — petits nodules de cellules épithélioïdes et mononucléaires dans le foie et méninges.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes ou sacrifiées à 25—95 jours): etits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires, fibroblastes et petits abcès contenant es bacilles acido-alcoolo-résistants dans le foie et le péritoine.

C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes ou sacrifiées à 15—50 jours); as de lésions à l'exception d'un cas (morte à 15 jours): rate septique avec hémorragie ulmonaire;

*b)* inoculation dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 15 -30 jours): rate septique, épatite, néphrite, cœlomite.

XIV. MYCOBACTERIUM PISCIS

A. *Cobayes: a)* inoculation sous cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 35—100 jours): pas de ésions caractéristiques. Excepté un seul cas (suspension associée, sacrifié à 150 jours) — nodu- es de cellules épithélioïdes, mononucléaires et fibroblastes dans la rate et les poumons;

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (morts ou sacrifiés à 15—40 jours): odules de cellules épithélioïdes, mononucléaires, polynucléaires et fibroblastes dans les gan- lions, poumons, foie, rate et péritoine.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure ou associée (mortes ou sacrifiées à 50—110 jours): as de lésions caractéristiques à l'exception d'un cas inoculé avec la suspension microbienne ssociée; mort à 50 jours: petits nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires et fibroblastes ans: le foie, rate et cœur.

*b)* inoculation intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure ou associée (mortes ou sacrifiées à 25—92 jours): etits nodules et cellules épithélioïdes, mononucléaires et petits abcès dans: la rate, foie et éritoine.

C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 8—18 jours): lésions d'hépa- te et rate septique;

*b)* inoculation dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure et associée (mortes à 8—10 jours): lésions d'hépa- te, rate septique, alvéolite fibrino-leucocytaire, néphrite et cœlomite (avec abcès).

XV. MYCOBACTERIUM SPECIES

A. *Cobayes: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiés à 15—35 jours): pas de lésions aractéristiques.

B. *Souris: a)* inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale:

1) avec suspension microbienne pure et associée (sacrifiées à 15—35 jours): pas de ésions caractéristiques.

C. *Grenouilles: a)* inoculation sous-cutanée:

1) avec suspension microbienne pure ou associée (mortes ou sacrifiées à 8—30 jours): n cas de mort spontanée — rate septique, alvéolite fibrino-leucocytaire, péricardite, hépatite t glomérulo-néphrite; pas de lésions en cas de survie.

*b)* inoculation dans la cavité cœlomique:

1) avec suspension microbienne pure ou associée (mortes ou sacrifiées à 5—30 jours): n cas de mort spontanée — rate septique, cœlomite, alvéolite fibrino-leucocytaire, hépatite t glomérulo-néphrite; en cas de survie — pas de lésions.

A part les lésions caractéristiques énumérées, on a observé aussi d'autres ésions que nous mentionnons par ordre de fréquence:

*Cobayes:* foyers pneumoniques banaux dans quelques cas avec cellules géantes multi- ucléées ou de grandes cellules plates à protoplasme finement réticulé (mousseuses) ou clair on-colorable; lésions d'hépatite, méningoencéphalite, réaction splénique, parfois avec hya-

linose périfolliculaire ou mégakaryocytes. Plus rarement: lésions dégénératives testiculaires, foie gras, lésions dégénératives des capsules surrénales et glomérulo-néphrite.

*Souris:* foyers pneumoniques banaux, parfois avec cellules mousseuses et foyers hémorragiques. De même que chez les cobayes, on a trouvé des lésions de hyalinose périfolliculaire splénique, méningo-encéphalite, hépatite, glomérulo-néphrite et lésions dégénératives testiculaires.

*Grenouilles:* lésions dues aux parasites (nodules).

Basés sur les expériences effectuées, nous pouvons conclure:

*I. Cobayes:* les cobayes infectés par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale avec les *Mycobacterium: rabinowitschi*, *graminis*, *grassbacillus*, *smegmatis*, *thamnopheos*, *crotin*, *grassbergeri*, *butyricum* et *friburgensis* n'ont pas présenté de lésions caractéristiques.

Les infections réalisées par voie intrapéritonéale avec suspension microbienne associée à l'huile de paraffine, ont provoqué des lésions caractéristiques avec les *Mycobacterium grassbergeri* et *butyricum* et celles effectuées par voie sous-cutanée avec le *Mycobacterium friburgensis*.

En ce qui concerne les autres espèces de mycobactéries, on a obtenu:

1. *M. pellegrini:* lésions caractéristiques par inoculation sous-cutanées et dissémination plus accentuée par voie intrapéritonéale, sans mort des animaux.

2. *M. phlei:* lésions caractéristiques par inoculation sous-cutanée; par injection intrapéritonéale les lésions sont plus intenses et peuvent provoquer la mort d'une partie des animaux.

3. *M. piscis:* lésions caractéristiques par inoculation sous-cutanée, seulement en présence de la suspension microbienne associée à l'huile de paraffine. Par voie intrapéritonéale — lésions caractéristiques et mort d'une partie des animaux, même par les microbes non-associés.

4. *M. chelonei:* lésions caractéristiques par voie sous-cutanée et intrapéritonéale, plus sévères et plus disséminées par association à l'huile de paraffine et notamment lorsque l'infection est pratiquée par voie intrapéritonéale, allant jusqu'à la mort de quelques animaux.

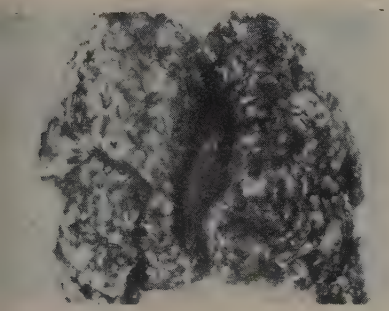
5. *M. ranae*: Lésions caractéristiques, plus discrètes et peu disséminées dans les infections sous-cutanées; par voie intrapéritonéale on ne les rencontre qu'en présence de la suspension associée à l'huile de paraffine. Tous les animaux ont survécu.

A remarquer la précocité des lésions qui apparaissent chez le cobaye, dès le 10-e jour de l'inoculation, pouvant persister jusqu'à 100 jours.

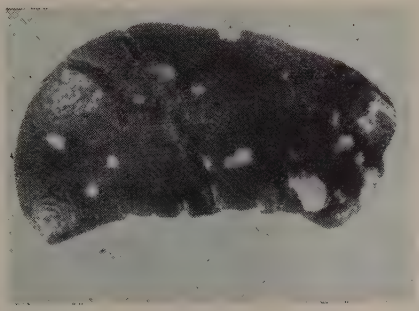
On a obtenu avec le *M. pellegrini* par voie intraveineuse des lésions caractéristiques discrètes et peu disséminées qui n'entraînent pas la mort des animaux; les injections intraveineuses avec le *M. chelonei*, associé ou non à l'huile de paraffine donnent des lésions caractéristiques disséminées, sévères, suivies de la mort des animaux.

Les examens bactériologiques des cobayes, à lésions caractéristiques dans 81% des cas ont montré la présence des bacilles acido-alcoolo-résistants, entre 8—102 jours après l'inoculation. Les animaux sans lésions caractéristiques ont donné des résultats positifs dans 60% des cas (11—14 jours après l'inoculation).

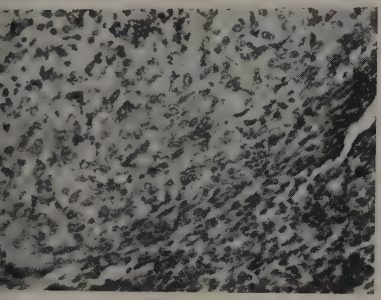
II. *Souris*: Les doses inoculées aux souris ont été, proportionnellement, beaucoup plus grandes que celles administrées aux cobayes. On a obtenu les résultats suivants:



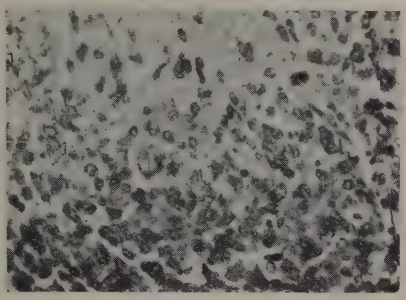
. Cobaye: *poumon* avec nodules disséminés ur toute la surface *(M. chelonei*, intraveineux associé)



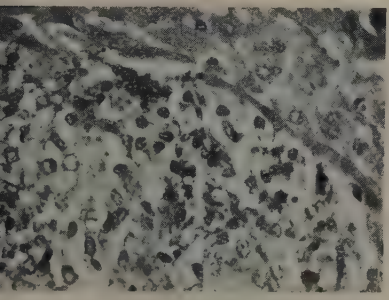
2. Cobaye: *foie* — quelques nodules à la surface *(M. chelonei*, intraveineux, associé)



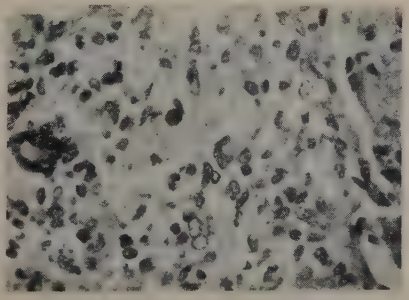
. Cobaye: *ganglion* avec nodule formé de ellules épithélioïdes et mononucléaires — 240. *(M. chelonei*, intraveineux, associé)



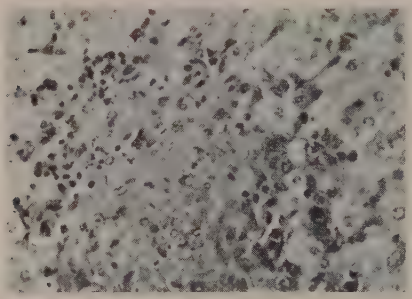
4. Cobaye: *rate*, nodule de cellules épithélioïdes et mononucléaires — × 400. *(M phlei*, intrapéritonéal)



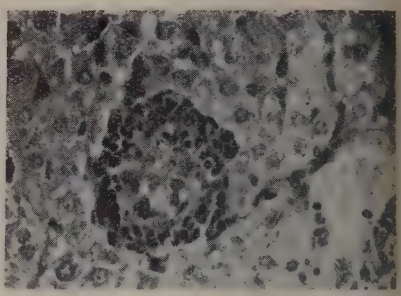
. Cobaye: *foie:* nodule de cellules épithéoïdes et mononucléaires — × 400. *(M, phlei*, intrapéritonéal)



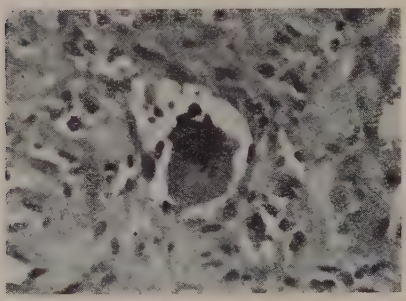
6. Cobaye: *poumon:* nodule de cellules, épithélioïdes, cellules géante-multinucléées, mononucléaires et polynucléaires — × 400, *(M. chelonei*, sous-cutané associé)



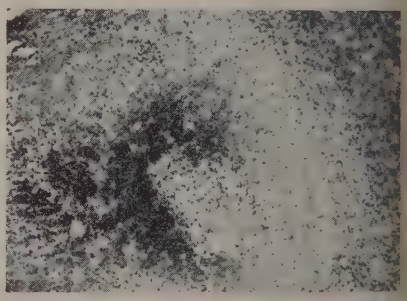
7. Cobaye: *surrénale* (corticale), nodule de cellules épithélioïdes et mononucléaires. × 240 (*M. grassbergeri* intrapéritonéal)



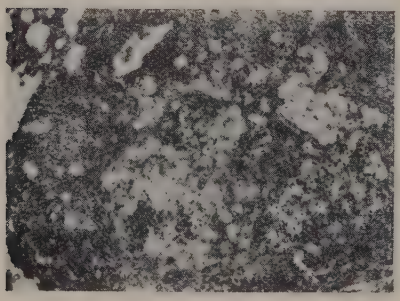
8. Rat: *foie:* nodules de cellules épithélioïdes et mononucléaires — × 400 (*M. phlei* intrapéritonéal)



9. Souris: *rate:* nodule péritonéal de fibroblastes, cellules épithélioïdes, mononucléaires, cellule géante multinucléée et tissu conjonctif hyalinisé — × 400. (*M. rabinowitschi* intrapéritonéal)

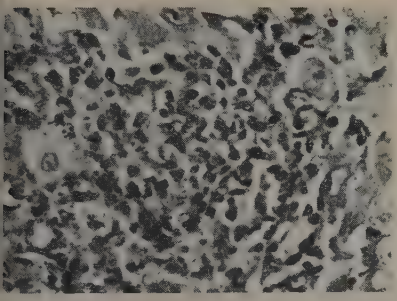


10. *Souris: foie:* nodule de fibroblastes, cellules épithélioïdes et polynucléaires en grand nombre (abcès) — × 100. (*M. chelonei* intrapéritonéal associé)

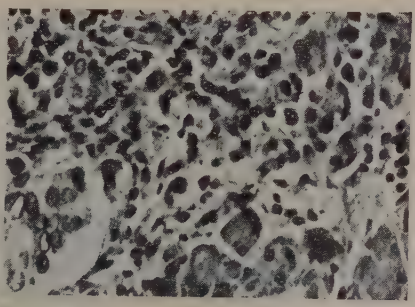


11. Souris: *poumon:* foyer pneumonique avec cellules écumantes — × 100. (*M. chelonei* sous-cutané associé)

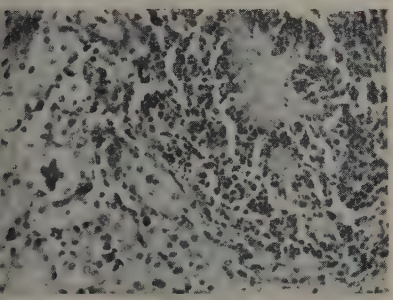
12. Souris: *poumon:* nodule de cellules épithélioïdes et mononucléaires — × 240 (*M. chelonei* intraveineux associé)



3. Souris: *coeur:* nodule de fibroblastes, llules épithélioïdes et mononucléaires × 400. *(M. chelonei* sous-cutané associé)

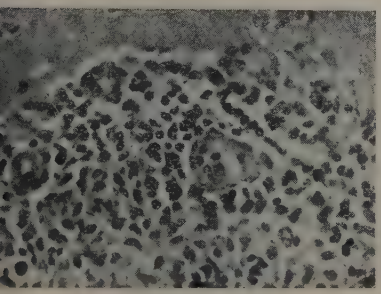


14. Souris: *pancréas:* nodule de fibroblastes cellules épithélioïdes, mononucléaires et polynucléaires — × 400. *(M. ranae* intrapéritonéal)

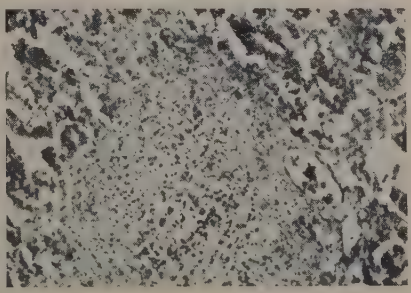


5. Souris: *reins:* nodule de cellules épihélioïdes, mononucléaires et polynucléaires × 240. *(M. phlei,* sous-cutané — associé)

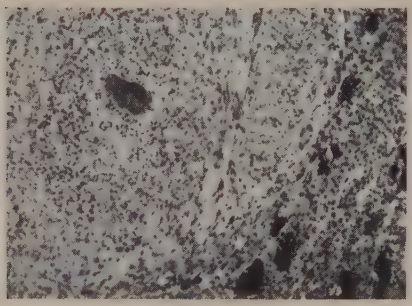
16. Souris: *cerveau:* nodule de cellules épithélioïdes, mononucléaires et polynucléaires (abcès) — × 400. *(M. pellegrini* sous-cutané)



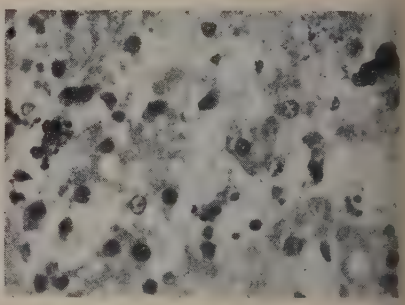
7. Souris: *Pia-mater:* nodule de fibroastes, cellules épithélioïdes, mononuéaires et polynucléaires — × 400. *(M. chelonei* intrapéritonéal — associé)



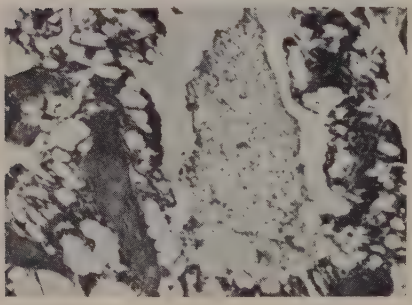
18. Grenouille: *rate:* foyer hémorragique-nécrotique leucocytaire — × 100 *(M. crotin* sous-cutané)



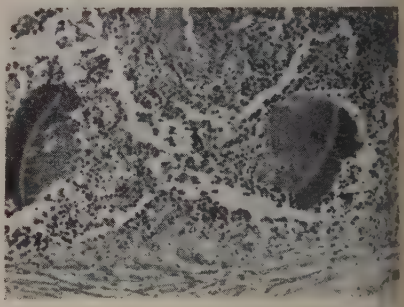
19. Grenouille: *foie:* nodule de cellules épithélioïdes, leucocytes, fibroblastes — × 100. (*M. rabinowitschi* sous-cutané — associé)



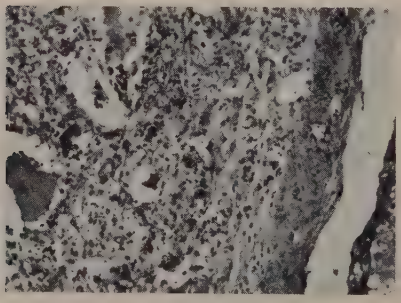
20. Grenouille: *foie:* hépatite aiguë (lésions dégénératives, infiltration graisseuse, réaction R. E., infiltration leucocytaire) — × 400 (*M. species* sous-cutané)



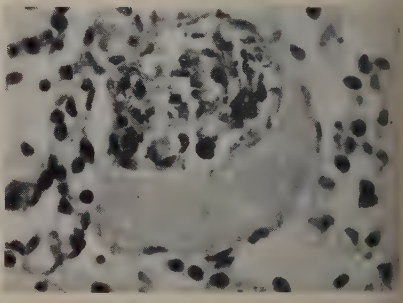
21. Grenouille: *poumon:* alvéolite aiguë fibrino-leucocytaire — × 100. (*M. piscis* sous-cutané)



22. Grenouille: *cavité coelomique* abcès avec réaction fibroblastique aux environs × 100. (*M. piscis* intracoelomique)



23. Grenouille: *coeur:* exsudat fibrino-leucocytaire de la séreuse — × 100 (*M. chelonei* intracoelomique, associé)



24. Grenouille: *reins:* glomérulo-néphrite (exsudat dans la capsule de Bowman, lésions dégénératives) — × 400. (*M. rabinowitschi* intracoelomique)

1. *M. grassbacillus*, *M. smegmatis* et *M. species*: pas de lésions caractéris-ques, ni mort des animaux, même lorsque la suspension a été associée à l'huile paraffine, exception faite pour le *M. grassbergeri*, qui a donné un cas positif ec mort de l'animal (inoculation intrapéritonéale de suspension associée à uile de paraffine).

2. *M. thamnopheos* et *M. crotin*: lésions caractéristiques seulement par ie intrapéritonéale (avec ou sans huile de paraffine).

3. *M. butyricum*: lésions caractéristiques seulement par voie sous-cutanée uspension associée ou non), sans provoquer la mort des animaux.

4. *M. pellegrini*: lésions caractéristiques par infections sous-cutanée et trapéritonéale, mais seulement en présence de la suspension associée à l'huile paraffine. Dans certains cas, mort des animaux.

5. *M. phlei*, *M. ranae*, *M. graminis*, *M. friburgensis* et *M. piscis*: lésions ractéristiques par inoculation sous-cutanée avec suspension pure ou associée; njection intrapéritonéale dans les mêmes conditions provoque aussi la mort de elques animaux.

6. *M. chelonei* et *M. rabinowitchi*: lésions caractéristiques par injection us-cutanée et intrapéritonéale avec suspension pure ou associée à l'huile, sans user la mort des animaux.

Les inoculations intrapéritonéales, associées à l'huile de paraffine ont donné général des lésions plus disséminées et plus sévères. Dans certains cas, on a bservé des lésions méningées caractéristiques avec les *M. phlei*, *rabinowitchi*, *iburgensis*, *chelonei* et même cérébrales avec le *M. pellegrini*.

Les lésions caractéristiques ont pu être mises en évidence à partir du 10-e 144-e jour.

Par voie intraveineuse, on a obtenu avec les *M. pellegrini*, *phlei* et *chelonei*, ns tous les cas, des lésions caractéristiques, suivies de la mort d'une partie s animaux. En plus, on a obtenu avec le *M. phlei* des lésions caractéristiques éningées.

Les examens bactériologiques ont montré: chez les souris avec lésions ractéristiques, dans 82% des cas, des résultats positifs (10—95 jours après noculation) et dans 18% des cas des résultats négatifs (10—24 jours). Les uris sans lésions caractéristiques ont donné, dans 77% des cas, des résultats sitifs (6—20 jours après l'injection).

III. *Grenouilles*: on a obtenu les résultats suivants:

1. *M. grassbacillus* — absence de lésions.

2. *M. pellegrini* et *M. ranae*, à part les lésions ont provoqué la mort s animaux par introduction dans la cavité cœlomique de la suspension icrobienne pure ou associée.

3. *M. rabinowitschi*, inoculé par voie sous-cutanée, en suspension non-asso-ée n'a produit ni lésions ni la mort des grenouilles.

4. Toutes les autres souches ont provoqué la mort des animaux, soit en talité, soit dans une proportion très élevée avec des lésions: (cœlomite, rate ptique, glomérulo-néphrite, alvéolite fibrino-leucocytaire et hémorragique, patite). Dans quelques cas les *M. crotin*, *chelonei* et *rabinowitschi* ont provoqué ssi des nodules caractéristiques, disséminés dans différents organes (foie, umons, reins et épicarde) avec des masses de bacilles acido-alcoolo-résistants

au centre. Les inoculations faites dans la cavité cœlomique avec suspension microbienne associée ont donné des lésions plus sévères.

L'examen bactériologique a montré dans tous les cas à rate septique des résultats positifs (4—5 jours après l'inoculation).

IV. *Rats*: l'infection a été effectuée seulement avec les *M. pellegrini* et *phlei* avec les résultats suivants:

1. L'injection intraveineuse avec suspension microbienne pure ou non-associée à l'huile de paraffine: absence de lésions caractéristiques et survie de l'animal.

2. Les inoculations sous-cutanées avec suspension microbienne associée ou non: lésions caractéristiques discrètes et survie des animaux.

7. Par voie intrapéritonéale avec suspension microbienne pure ou associée, le *M. phlei* a provoqué des lésions caractéristiques discrètes et le *M. pellegrini* des lésions plus disséminées, suivies de la mort de quelques animaux.

## CONCLUSIONS

1. Les bacilles paratuberculeux isolés du lac Noir de Sovata, ont provoqué chez les animaux inoculés, par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale, des lésions semblables aux lésions tuberculeuses caractéristiques: nodules de cellules épithélioïdes, mononucléaires, fibroblastes, cellules géantes, abcès.

2. Les cobayes se sont montrés les plus réceptifs à l'infection, présentant constamment des lésions avec les souches: *M. pellegrini*, *M. phlei*, *M. chelonei* et des lésions inconstantes avec: *M. ranae*, *M. piscis*, *M. grassbergeri*, *M. butyricum* et *M. friburgensis*. On a enregistré assez souvent la mort des animaux, provoquée par: *M. phlei*, *M. chelonei* et *M. piscis*.

3. Les souris ont été constamment réceptives aux souches: *M. chelonei* et *M. rabinowitschi* et, plus rarement, aux souches *M. pellegrini*, *M. phlei*, *M. ranae*, *M. grassbergeri*, *M. graminis*, *M. thamnopheos*, *M. crotin*, *M. butyricum* et *M. friburgensis*. La mort des souris n'a été causée que par: *M. pellegrini*, *M. phlei* *M. grassbergeri* et *M. piscis*.

4. En général, les rats ont été sensibles au *M. phlei* associé à l'adjuvant et au *M. pellegrini* seulement dans le cas d'inoculation intrapéritonéale avec suspension associée à l'huile de paraffine.

5. L'infection intraveineuse avec *M. pellegrini*, *M. phlei* et *M. chelonei* a provoqué des lésions caractéristiques et la mort des cobayes et des souris.

6. Les grenouilles sont très sensibles à toutes les espèces microbiennes testées, à l'exception du M. Grassbacillus présentant des lésions septicémiques aiguës et parfois même des nodules caractéristiques et abcès. Certaines souches ont provoqué la mort des animaux.

7. Les inoculations intrapéritonéale et intracœlomique, associées à l'huile de paraffine, donnent en général des lésions plus disséminées et plus sévères.

8. A part les résultats bactériologiques positifs obtenus chez les cobayes et souris avec lésions caractéristiques on a obtenu des résultats positifs aussi dans les cas sans lésions ce qui prouverait (pour ces animaux) qu'au début de l'infection il existerait un état septicémique, qui guérit parfois spontanément. Chez la grenouille les résultats bactériologiques positifs ont toujours coïncidé avec les états de septicémie.

BIBLIOGRAPHIE

Bertrand I., Bablet I et Bloch Fl. — C.R. Soc. Biologie, 1938, **128,** 993.
Cabasso V. — Arch. Inst. Pasteur de Tunis, 1941—1942, **30—31,** 26.
Galli-Valerio et Bornand M. — Zentralblatt f. Bakt. Orig. 1927. **101,** 182.
Hauduroy P. — Considérations sur le pouvoir pathogène expérimental des bacilles paratuberculeux, Paris, Masson, 1946, 138.
Laporte R. — Ann. Inst. Pasteur, 1940, **65,** 282 et 415., id. 1941, **66,** 284.
Stanley Griffith. — Tubercle, 1933—1934, **115,** 53.

## ИЗУЧЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПАЛОЧЕК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ И ГРЯЗИ ЧЕРНОГО ОЗЕРА СОВАТА

### КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Из проведенных исследований следует:

1. Подкожное или внутрибрюшенное введение животным паратуберкулезных палочек, выделенных из Черного Озера Совата, вызвало изменения, характерные, состоящие из узелков эпителияльных клеток, одноядерных, фибробластов, гигантских клеток, абсцессов.

2. Наиболее восприимчивыми животными оказались морские свинки, у которых получали закономерно изменения при применении следующих штаммов: M. pellegrini, M. phlei и M. chelonei.

Наблюдались также непостоянно изменения при применении M. ranae, piscis, Grassberger, putiricus u friburgensis.

Довольно часто наблюдалась гибель животных, зараженных с M. phlei, chelonei и piscis

3. Мыши оказались во всех случаях восприимчивыми к M. chelonei и rabinowitch несколько реже к M. pellegrini. phlei, ranae, grassberger, graminis, thamnobheus crotin, putiricum и friburgensis

Гибель мышей наблюдалась только при применении M. pelleg ini, phlei, grassberger piscis.

4. Крысы оказались во всех случаях чувствительными по отношению к M. phlei только в нескольких случаях к M. pellegrini.

5. Заражение внутривенным путем с M. pellegrini, phlei и chelonei вызвало характерные изменения и гибель морских свинок.

Мыши чувствительны ко всем трем видам и гибнут, если заражение производят внутривенным путем.

6. Лягушки очень чувствительны по отношению ко всем испытуемым штаммам с исключением M. Grassberger. Введение данных штаммов вызвало у этих животных острые септицемические изменения, а иногда даже появление микроабсцессов. Некоторые штаммы вызвали даже гибель животных.

7. В общем наблюдались более тяжелые и более распространенные изменения при внутрибрюшинном пути введения, при введении в общую полость и при совместном введении парафинового масла.

8. Наряду с положительными результатами бактериологического исследования, полученными у животных с характерными поражениями, наблюдались положительные результаты также и при отсутствии типичных изменении. Это свидетельсвует о том, что у морских свинок и мышей возможно наличие в ранних стадиях инфекции септицемического состояния, иногда излечивающегося само по себе. У лягушек положительные результаты бактериологического исследования совпадали во всех случаях с септицемией.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER EXPERIMENTELLEN PATHOGENITÄT VON AUS DEM WASSER UND SCHLAMM DES „SCHWARZEN SEES" IN SOVATA ISOLIERTEN PARATUBERKELBAZILLEN.

### ZUSAMMENFASSUNG

Aus den dargelegten Untersuchungen ergibt sich folgendes:

1) Subkutane oder intraperitoneale Einspritzungen von aus dem „Schwarzen See" Sovata isolierten Paratuberkelbazillen bei Tieren, rufen charakteristische Schä-

den hervor, die durch Epithelioidzellen, Rundzellen, Fibroblasten und Riesenzellen enthaltende Knötchen und durch Abszesse dargestellt werden.

2) Am empfänglichsten erwiesen sich Meerschweinchen, bei welchen regelmässig Läsionen mit folgenden Stämmen hervorgerufen werden konnten: *Myco. Pellegrini*, *Myco. phlei* und *Myco. chelonei*. Weniger regelmässig wurden Schäden auch durch *Myco. ranae*, *Myco piscium*, *Myco. Grassberger*, *Myco. butyricum* und *Myco. frieburgensis* verursacht. Ziemlich oft führte die Einimpfung von *Myco.* phlei, *Myco. chelonei* und *Myco. pisciuim* zum Tod der Tiere.

3) Mäuse waren in allen Fällen für *Myco. chelonei* und *Myco. Rabinowitsch* empfänglich und seltener für *Myco. Pellegrini*, *Myco. phlei*, *Myco. ranae*, *Myco. Grassberger*, *Myco. graminis*, *Myco. thamnopheos*, *Myco. Crotin*, *Myco. butyricum* und *Myco. frieburgensis*. Der Tod wurde bei Mäusen nur durch *Myco. Pellegrini*, *Myco. phlei*, *Myco. Grassberger* und *Myco, piscium* hervorgerufen.

4) Ratten waren in allen Fällen für *Myco. phlei* und nur in einigen für *Myco. Pellegrini* empfänglich.

5) Intravenöse Infizierung von Meerschweinchen mit *Myco. Pellegrini*, *Myco.* phlei und *Myco. chelonei* führte zu charakteristischen Läsionen und zum Tod der Tiere.

Mäuse sind für alle drei Arten empfänglich. Auch Tod der Tiere kann eintreten, wenn die Infizierung auf intravenösem Wege erfolgt.

6) Frösche sind für alle untersuchten Arten sehr empfänglich ausser für *Myco. Grassbacillus*. Es traten akute septikämische Läsionen und mitunter sogar charakteristische Mikroabszesse und Knötchen auf. Einige Stämme bewirkten auch den Tod der Tiere.

7) Im allgemeinen, bildeten sich verstreutere und schwerere Schäden aus, wenn die Einspritzungen auf intraperitonealem oder intracoelomischem Wege verabreicht wurden und wenn Paraffinöl zugesetzt wurde.

8) Ausser den positiven bakteriologischen Ergebnissen, die in Fällen mit charakteristischen Schäden erhalten wurden, ergaben sich positive Resultate auch in Fällen, die keine typischen Läsionen aufwiesen. Dies zeigt, dass beim Meerschweinchen und bei der Maus, am Beginn der Infektion, ein septikämischer Zustand vorliegen kann, der manchmal spontan ausheilt. Bei Fröschen fielen positive bakteriologische Resultate immer mit septikämischen Zuständen zusammen.

## CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE EXPERIMENTAL PATHOGENIC ACTION OF PARATUBERCULOSIS BACILLI ISOLATED FROM THE WATER AND MUD OF THE „BLACK LAKE" IN SOVATA

SUMMARY

The following conclusion may be drawn from the foregoing investigations:

1. Subcutaneous or intraperitoneal inoculations in animals of paratuberculosis bacilli isolated from the „Black Lake" in Sovata gave rise to characteristic lesions consisting of nodules containing epithelioid cells, round cells, fibroblasts, giant cells, and abscesses.

2. The most susceptible animals proved to be guinea-pigs, in which lesions could be regularly provoked by the following strains: *Myco. Pellegrini*, *Myco. phlei*, and *Myco. chelonei*. Inconstantly, lesions could also be engendered by the inoculation of *Myco. ranae*, *Myco. piscium*, *Myco. Grassberger*, *Myco. butyricum*, and *Myco. frieburgense*. Fairly often the inoculation of *Myco. phlei*, *Myco. chelonei*, and *Myco. piscium* resulted in death of the animals.

3. Mice were susceptible in all cases to *Myco. chelonei* and *Myco. Rabinowitsch* and seldomer to *Myco. Pellegrini*, *Myco. phlei*, *Myco. ranae*, *Myco. Grassberger*, *Myco. graminis*, *Myco. thamnopheos*, *Myco. Crottin*, *Myco. butyricum*, and *Myco-frieburgense*. Death of the animals was caused only by *Myco. Pellegrini*, *Myco phlei*, *Myco. Grassberger*, and *Myco. piscium*.

4. Rats were susceptible in all cases to *Myco-phlei* and in some cases to *Myco. Pellegrini*.

5. Infection by the intravenous route with *Myco. Pellegrini*, *Myco. phlei*, and *Myco. chelonei* caused characteristic lesions and death in guinea-pigs.

Mice are susceptible to all three species, which cause death when the animals are infected by the intravenous route.

6. Frogs are highly susceptible to all the spečies tested excepted to the *Myco. Grass-illus.* They displayed acute septicaemic lesions and sometimes even caracteristic micro-cesses and nodules. Some strains even caused death of the animals.

7. As a rule, severe and more widespread lesions were obtained following intraperito-al and intracoelomic inoculation, and when paraffin oil was associated with the germs.

8. Apart from positive bacteriological results in cases displaying characteristic ions, positive results were also obtained in cases which exhibited no typical lesions. his shows in mice and guinea-pigs a septicaemic state may exist in the initial stage of the ection, which may be followed by spontaneous recovery. In the frogs, positive bacterio-ical results always coincided with septicaemic states.

# THE TRANSFER OF ANTI-PROTEIN ANTIBODY PRODUCTION IN THE GUINEA-PIG BY MEANS OF LYMPHONODULAR CELL SUSPENSIONS

by

AL. ȚURCANU and A. FÉNYVES

*(This work was carried out in the Department of Serology and Haematology of the « Dr. I. Cantacuzino » Institute, Bucharest)*

— Received for publication August 13, 1959 —

The transfer of antibody formation by means of cell suspensions from immunized animals has been successfully performed by various investigators (1, 2, and many others). As a rule, in experiments of this type bacterial cells or extracts have been used as antigens, and rabbits as recipients. The present paper is concerned with the transfer of antibody formation from *guinea-pigs* immunized with a *protein* antigen, to normal recipients. The reasons for this choice are discussed below.

## MATERIAL AND METHODS

*Animals.* Nine groups of 12—15 guinea-pigs of 500—700 g. body weight were used as donors. The recipients were normal guinea-pigs of 400—500 g. body weight.

*Antigens.* Normal horse serum (HS) was administered to groups Nos. 1, 2, 4—9, and crystallized horse serum albumin (HSA, 8% solution) to group No. 3. The antigens were used in the fluid state (FA) or mixed with adjuvants as follows:

— FA (1 part) + heat-killed *Br. suis* suspension ($10^9$ germs/ml., 3 parts) = BrA

— Alum-precipitated horse serum, according to (3) (0.25 ml. HS/ml.) = AlA

— Antigen in a *Freund*-type emulsion (4) containing HS or HSA (2 parts) + Lanolin (1 part) + Paraffin oil (2 parts), with or without the addition of heat-killed *Br. suis* (100 mg. moist weight/ml.) or *Myco. tuberculosis* (3 mg. dry weight/ml.) = OA + Br. or Myco.

*Inoculations.* As a rule, the animals were given a first injection of 0.5 ml. OA + Br. (Groups Nos. 1, 2, 4, 5), OA + Myco. (Group No. 3), OA (Groups Nos. 6, 7) or FA (Group No. 8) into the subcutaneous tissue of the neck (basic immunization). After an interval of 6 months, a second, intradermal injection of 0.2 ml. FA, BrA or AlA was made into the dorsal aspect of both hind-paws

(Groups Nos. 4—9) or of all four paws (Groups Nos. 1—3). A third and last inoculation of 0.1 ml. FA or BrA was administered two weeks later, again intradermally, into the dorsal aspect of the paws. Groups Nos. 1—3 were injected into all four paws, groups Nos. 8, 9 into both hind-paws, and groups Nos 5—7 into the left hind-paw only. The first inoculation was omitted in group No. 9, and the third in group No. 4. This rather complicated schedule was adopted in order to obtain an intense immunization of the donors, as well as certain indications concerning the effect of the booster injection.

*Transfer.* Transfers were performed on the 3rd or 4th day after the last inoculation. The animals were anaesthetized with chloralose-urethan and killed by exsanguination from the heart. The regional lymph nodes (axillary, popliteal, inguinal and of the flank in groups Nos. 1—3; only the latter three in groups Nos. 4—9) were collected in chilled Hanks solution. Cell suspensions were obtained according to the method described in (1,5) with the sole difference that the nodes were not teased with needles, but cut into small pieces with sharp scissors and finally expressed through fine-meshed gauze. Hanks solution + 10% normal guinea-pig serum + 0.2 mg. streptomycin/ml. was used throughout. The cells of all donors of the same group were pooled. Separate cell pools were prepared in groups Nos. 4—7 from the lymph nodes corresponding to the left hind-paw (into which the last booster inoculation had been made) and from those corresponding to the right hind-paw (3rd inoculation not performed).

Cell counts were made in a Bürker-Türk chamber.

The cell suspensions were inoculated into the denuded saphenous vein of 3—5 normal recipients per donor group. Each group of recipients included controls receiving equivalent amounts of cells killed by heating at 56°C for 1/2 hour. In groups Nos. 5—7, equal amounts of cells obtained from the lymph nodes corresponding to the left hind-paw (booster inoculation) or to the right hind-paw (no booster inoculation) respectively were transferred to different recipients (i.e. two per group).

*Tests.* Blood was collected from some of the recipients by heart puncture, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, and 30 days after cell transfer. The sera were kept at 4°C and titrated in passive agglutination tests with sensitized tanned red blood cells, according to *Boyden's* method as described in (6). The red cells were tanned with a 1/40.000 tannic acid solution and sensitized with a 1/1000 antigen dilution. Titres were expressed as the reciprocal of the highest dilutioh causing clear-cut agglutination (2+).

Other recipients were tested for anaphylactic sensitization by the intravenous injection (saphenous vein) of 1 ml. normal horse serum, 3—7 days after the transfer. From these recipients blood was collected only once, immediately before the eliciting inoculation. Post-mortem examinations were performed in the animals which died during anaphylactic shock.

## RESULTS

A. *Antibodies.* Antibody titres in the sera of recipients of killed cells (9 animals) never exceeded 20 (practically insignificant). The blood sera of animals which had received viable cell suspensions (14 animals) regularly contained anti-

odies in considerable amounts. The titres and their evolution in time are shown n Table 1.

*Table* 1

**Antibody Titres in Recipients of Viable Cells**

| Group No. | Basic Immunization | Booster inoculation *) | No. of cells transferred | Antibody titres on days following transfer | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1 | 3 | 5 | 7 | 10 | 14 | 21 | 30 |
| 1 | OA+Br. | + | $250\times10^6$ | 5120 | 20480 | 40960 | 20480 | 20480 | 10240 | 5120 | 2560 |
| 2 | OA+Br. | + | $200\times10^6$ | 1280 | 5120 | 10240 | 10240 | 10240 | 5120 | 1280 | 640 |
| 3 | OA+Myco. | + | $250\times10^6$ | 1280 | 10240 | 81920 | 327680 | 163840 | 81920 | 20480 | 2560 |
| 4 | OA+Br. | − | $60\times10^6$ | 640 | 12080 | 2560 | 2560 | 1280 | 640 | 320 | 160 |
| 5 | OA+Br. | + | $125\times10^6$ | 2560 | 10240 | 20480 | 20480 | 20480 | 20480 | 5120 | 2560 |
| | | − | $125\times10^6$ | 320 | 1280 | 1280 | 2560 | 1280 | 1280 | 640 | 160 |
| 6 | OA | + | $27\times10^6$ | 640 | 1280 | 2560 | 5120 | 2560 | 1280 | 640 | 640 |
| | | − | $27\times10^6$ | 80 | 160 | 320 | 320 | 320 | 160 | 40 | 40 |
| 7 | OA | + | $55\times10^6$ | 80 | 640 | 5120 | 10240 | 20480 | 10240 | 5120 | 640 |
| | | − | $55\times10^6$ | 40 | 80 | 160 | 228 | 160 | 160 | 80 | 20 |
| 8 | FA | + | $40\times10^6$ | 113 | 905 | 2560 | 1280 | 1810 | 1280 | 320 | 160 |
| | | + | $20\times10^6$ | 40 | 320 | 640 | 1280 | 905 | 320 | 80 | 20 |
| | | + | $10\times10^6$ | 20 | 160 | 452 | 320 | 320 | 452 | 160 | 40 |
| 9 | — | + | $100\times10^6$ | 40 | 80 | 160 | 160 | 40 | 20 | 20 | 10 |

*) Booster inoculation: + = Cells from the lymph nodes corresponding to the paws into which the booster inoculation was made.
— = Cells from the lymph nodes corresponding to the hind-paw into which no booster inoculation was made.

As may be seen from this table, antibodies appeared in the blood serum on e first day following cell transfer, in titres ranging up to 5,120. During the llowing days the titres increased, reaching a maximum (160—327, 680) on e 3rd-7th day, in order progressively to decrease during the following three eeks. Yet, even on the 30th day quite considerable amounts of antibody could detected (up to titre 2,560).

There is a direct correlation between the number of cells transferred and e maximum titres attained. This may be seen in recipients of different amounts

of cells obtained from different donor groups (Groups Nos. 4,5 and Nos. 6, 7), as well as in recipients of different amounts of cells from the same donor group (No. 8). Obviously, the correlation is not a linear one.

No less obvious is the effect of the last (booster) inoculation. Maximum titres in recipients of cells obtained from the lymph nodes corresponding to the left hind-paw (booster inoculation) were considerably higher (up to 16 times) than those in recipients of cells from the lymph nodes corresponding to the right hind-paw of the same donors (no booster inoculation) (Groups Nos. 5—7). There is some evidence for the action exerted by the type of basic immunization, inasmuch as maximum titres in the recipients appear to be higher when adjuvants, and especially mycobacteria, are used for the first inoculation (Group No. 3). The donors of group No. 9 were given only one inoculation of AlA and a booster inoculation 14 days later. Titres in the recipients were very low (nearly insignificant). Yet, the number of comparable experiments is too small to warrant any definite conclusion.

B. *Anaphylactic shock.* Anaphylactic sensitivity was tested in the recipients of 6 of the 9 transfers. The controls which had received killed cell suspensions displayed no pathological reaction whatsoever. The reactions of the recipients of viable cells are shown in Table 2.

*Table 2*

**Anaphylactic Shock in Recipients of Viable Cells.**

| Donors. Group No. | Number of cells transferred | Days following transfer | Antibody titre | Result | Post-mortem examination |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $250 \times 10^6$ | 7 | 20480 | Lethal shock | Typical pattern |
| 2 | $200 \times 10^6$ | 7 | 10280 | Lethal shock | Typical pattern |
| 4 | $100 \times 10^6$ | 3 | 20480 | Lethal shock | Typical pattern |
| 5 | $100 \times 10^6$ | 3 | 1810 | Severe shock | — |
| 6 | $42 \times 10^6$ | 3 | 2560 | Slight shock | — |
| 9 | $100 \times 10^6$ | 5 | 160 | Severe acute shock<br>Lethal protracted shock | Atypical pattern |

Typical anaphylactic shock occurred in 5 cases; in 3 of them it resulted in death within 5—10 minutes. At post-mortem examination the recipients which had died displayed the characteristic pattern of acute pulmonary emphysema, the anterior aspect of the heart being almost completely hidden by the inflated lungs. In the two guinea-pigs which did not die, the well-known symptoms of anaphylactic shock were recorded, i.e. sneezing, coughing, dyspnoea, loss of urine and faeces, etc. The recipient of viable cells from donor group No. 9 displayed a somwhat peculiar reaction. During the first few minutes after the eliciting inoculation, typical symptoms of intense acute anaphylactic shock set in: coughing and severe dyspnoea, followed by convulsions. After 10—15 minutes the animal recovered to a certain extent and for some minutes appeared to be almost normal. However, a condition of progressive coma gradually set in, the animal was lying on its side, respiration was superficial and slowed up, and death

ccurred at the end of about 30—40 minutes. At post-mortem examination, the ıng was normal while the whole digestive tract and particularly the stomach isplayed very intensive congestion. On the whole, an initial syndrome of acute hock was followed by one of so-called "protracted shock", as commonly oberved to occur in sensitized guinea-pigs after intraperitoneal inoculation of the ntigen. However, the antibody titre in this recipient was very low. Thus, the naphylactic pathogenesis of the symptoms may be questioned and therefore the nimal was not included in the number of deaths due to anaphylactic shock.

## DISCUSSION

The results obtained in the present investigation are not significantly diferent from those of other authors. Tests *in vitro* (passive agglutination) as well s *in vivo* (anaphylactic shock) regularly demonstrated the presence of antibodies in the recipients. As regards the origin of these antibodies, there are two ıain pitfalls in experiments of this kind, i.e. passive immunization of the reciients by preformed antibody, and active immunization by small amounts of ntigen carried over with the transferred cells.

When bacterial cells or extracts are used as antigens and rabbits as recipients, mall but definite amounts of antibody are very often detected at a certain moment ı the blood sera of recipients of killed donor cells, i.e. active immunization ccurs. In order to minimize this possibility, very young or irradiated animals re used as recipients. In both cases the respective animals are known to be incaable of forming antibodies on their own account. However, there is a remote ossibility that some factor present in viable donor cells, but not specifically elated to antibody formation, might enable even irradiated recipients to form ntibodies under the influence of minute antigen amounts carried over with the ells. If a factor of this kind were destroyed or inactivated in killed cells, the bsence of antibodies in irradiated recipients of such cells would obviously ot be a satisfactory proof of the non-interference of active immunization in ecipients of viable cells.

In order to preclude any such eventuality, it was attempted in the present ork to use *normal* animals as recipients. In the body of such animals, any factor ot specifically related to antibody formation, which might also exist in viable onor cells, is *a priori* present. Thus, if an adequate immunological stimulus is upplied by the antigen carried over with (viable or killed) donor cells, active mmunization is bound to occur, i.e. antibodies will appear in the blood sera f the recipients, regardless of the viability of the transferred cells. On the other and, if antibodies do not appear in recipients of killed cells, it may be safely nferred that the antigen possibly carried over affords no adequate immunolo-ical stimulus, i.e. active immunization is out of the question. The low respon-iveness (as regards antibody formation) of guinea-pigs to single injections of rotein antigens being a well-known fact, the experimental pattern of the present ork was devised on the assumption that minute antigen amounts which might e contained in the transferred cells would be insufficient to determine active mmunization even in normal (non-irradiated) animals. The results obtained ı the controls proved this assumption to have been correct, i.e. no significant mounts of antibody appeared in (normal) recipients of killed cells. Thus, active

immunization may be excluded in the case of recipients of viable cells as well. At the same time, passive immunization by antibodies carried over with the transferred cells is likewise out of the question, as heating at 56°C for 1/2 hour could not have destroyed such antibodies (nor, for that matter, any existing antigen). Obviouly, the donor cells contained no significant amounts of preformed antibody, and traces of antigen possibly present in these cells were not apt by themselves to cause active antibody production in the body of the recipient.

Under these circumstances, the appearance of antibodies in recipients of viable cells may be accounted for in only two ways.

*a)* Either these antibodies were formed by the transferred cells themselves.

*b)* Or the transferred cells contained some *specific* antibody "precursor" which was transformed into serologically active antibody by the cells of the recipient. However, the release of this specific "precursor" is strictly dependent upon the viability of the transferred cells.

Thus, on the whole, the present work confirms similar conclusions reached by other investigators using different methods.

SUMMARY

Guinea-pigs were immunized with horse serum and crystallized horse serum albumin. Lymphonodular cells from these animals were transferred to normal non-irradiated recipients.

In recipients of viable cells, relatively large amounts of antibody were regularly demonstrable in the blood serum, and anaphylactic shock could be elicited by the intravenous inoculation of horse serum. No significant amounts of antibody were detectable and no anaphylactic reaction could be elicited in recipients of killed cells.

The significance of these results as regards the transfer of antibody formation is discussed.

REFERENCES

1. Harris S., Harris T. N., Farber N. B. — J. Immunol., 1954, **72**, 148.
2. Sterzl J. — Folia Biologica, 1955, **1**, 193.
3. Proom H. — J. Path. a. Bact., 1943, **55**, 419.
4. Freund J. — Ann. Rev. Microbiol., 1947, **1**, 291.
5. Uhr J. W., Salvin S. B., Pappenheimer A. M. Jr. — J. exp. Med., 1957, **105**, 11.
6. Borduas A. G., Grabar P. — Ann. Inst. Pasteur, 1953, **84**, 903.

## ПЕРЕДАЧА СПОСОБНОСТИ ОБРАЗОВАТЬ ПРОТИВОБЕЛКОВЫЕ АНТИТЕЛА МОРСКИМ СВИНКАМ, ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ ВЗВЕСЕЙ ЛИМФОУЗЛОВЫХ КЛЕТОК

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Морские свинки иммунизировались лошадиной сывороткой и кристаллизованным сывороточным альбумином лошади; от таких свинок перевивали лимфоузловые клетки нормальным, необлученным реципиентам.

У реципиентов живых клеток закономерно выявляли наличие в сыворотке относительно больших количеств антител и удалось вызвать анафилактический шок путём внутривенного введения лошадиной сыворотки. У животных, которым вводили убитые клетки, не обнаружены антитела в значительных количествах и не удалось вызвать анафилактическую реакцию.

Обсуждается значение полученных результатов в связи с передачей способности образовать антитела.

## LE TRANSFERT DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS ANTIPROTÉIQUES CHEZ LE COBAYE PAR DES SUSPENSIONS DE CELLULES LYMPHONODULAIRES

RÉSUMÉ

Des cellules lymphonodulaires obtenues de cobayes immunisés avec du sérum de cheval ou avec de la sérumalbumine de cheval cristallisée ont été transférées à des animaux normaux, non-irradiés.

Chez les animaux ayant reçu des cellules viables, l'apparition d'anticorps en quantité considérable fut régulièrement constatée dans le sérum sanguin, et le choc anaphylactique put être déclanché par l'injection intraveineuse de sérum de cheval. Le sérum d'animaux ayant reçu des cellules tuées ne contenait pas d'anticorps en quantité significative et aucune réaction anaphylactique ne put être déclanchée chez ces animaux.

La signification de ces résultats à l'égard du transfert de la formation d'anticorps est discutée.

## DIE ÜBERTRAGUNG DER BILDUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN EIWEISSANTIGENE BEIM MEERSCHWEINCHEN, DURCH AUFSCHWEMMUNGEN VON LYMPHKNOTENZELLEN

ZUSAMMENFASSUNG

Meerschweinchen wurden mit Pferdeserum oder kristallisiertem Pferdeserumalbumin immunisiert. Von diesen Tieren gewonnene Lymphknotenzellen wurden auf normale, nicht bestrahlte Empfänger übertragen.

Im Blutserum von Empfängern lebensfähiger Zellen konnten verhältnismässig grosse Antikörpermengen regelmässig festgestellt werden. Die intravenöse Injektion von Pferdeserum löste bei diesen Tieren einen anaphylaktischen Schock aus. Bei Empfängern abgetöteter Zellen waren keine nennenswerten Antikörpermengen im Blutserum nachweisbar und anaphylaktische Reaktionen konnten bei diesen Tieren nicht ausgelöst werden.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse in Bezug auf die Übertragung der Antikörperbildung wird besprochen.

# RECHERCHES SUR UNE POLYANATOXINE ANAÉROBIE

## I. IMMUNISATION ACTIVE EXPÉRIMENTALE PAR L'ANATOXINE PERFRINGENS CONCENTRÉE, PURIFIÉE ET ADSORBÉE SUR PHOSPHATE D'ALUMINIUM

par

A. Olaru, J. Bittner, H. Kranzdorf, Viorica Voinesco et Al. Turburi

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Anaérobies)*

— Manuscrit reçu le 9 mars 1960 —

Tous les auteurs sont d'accord que le *Cl. perfringens* de type A détient le ôle principal dans le déclanchement de la gangrène gazeuse chez l'homme (1, 2). En tenant compte de la nature sûrement antitoxique de l'immunité anti-erfringens (3, 4, 5, 6), *seules* les recherches en vue de l'obtention d'anatoxines orrespondantes présentent un intérêt, en ce qui concerne l'immunisation active ontre l'infection produite par ce germe.

En cette direction on a obtenu de bons résultats, dans la période qui a uivi la seconde guerre mondiale, lorsqu'on a utilisé pour les animaux et les ommes des anatoxines purifiées et concentrées, précipitées avec alun ou dsorbées sur support minéral (7, 8, 9, 10).

Actuellement on a étendu les recherches, en étudiant plus en détail les ifférents problèmes, tels: l'amélioration de la qualité et pureté des antigènes, ıode d'administration et choix du modèle expérimental et conditions d'asso-iation aux autres antigènes gangréneux (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 0, 21, 22, 23, 24, 25).

★

En vue de la production d'une polyanatoxine anaérobie, nous avons étudié lans une série de travaux antérieurs les aspects variés de l'immunisation active vec l'anatoxine vibrion septique (26, 27, 28, 29). Dans la présente note, nous lonnons un bref exposé des résultats obtenus dans l'immunisation active expéri-nentale antiperfringens.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Toxine et anatoxine utilisées.* a) *Milieu de culture:* bouillon de culture ope-mélange en parties égales de solution de digestion tryptique de viande le bœuf avec macéré de viande. Le milieu final contenant de l'azote amini-ue 110—120 mg %, est réparti en quantités de 2—8 l dans des ballons appro-

priés, en introduisant au fond du ballon une certaine quantité de coton hydrophile, ainsi que de la viande hachée, en additionnant, avant la régénération, de la dextrine à 3% (B.D.H.). —

b) *Souche: Cl. perfringens* type A—B.P.$_6$K. reçue en 1955 de l'Institut Tarasevici de Moscou, conservée sur bouillon Pope-blanc d'œuf ou bouillon Pope gélosé 0,1%, gélatiné 0,4% et viande. La semence est incorporée au milieu en proportion de 1% après un passage préalable de 10—18 heures sur le même milieu.

c) *Période de toxigénèse:* 16 heures à 33° — suivie de centrifugation et filtrage du surnageant par filtre Seitz E.K.

d) *Activité des toxines:* la toxine centrifugée a une valeur de 3—10 U.C./ml « in vitro »; après filtrage elle a 3—8 U.C./ml et 300—500 D.L.M. souris/ml. Titrage des U.C. par la méthode avec lécitho-vitelline.

e) *Détoxification*: complète après addition de formol 5‰ et conservation à 37° — 25 jours en moyenne. Le contrôle s'effectue d'après l'absence de la réaction de la lécithinase; chez les souris, 0,5 ml administrés par voie intraveineuse ne provoquent pas la mort de l'animal et chez les cobayes 0,2 ml injectés par voie intradermique ne provoquent pas de nécrose.

f) *Concentration et purification:* les anatoxines natives, avec titres en U.C. de 2—4/ml ont été concentrées et purifiées à l'acide métaphosphorique 10% à pH = 3,3, le précipité formé étant dissout dans un tampon boré (pH = 7,2). Rendement moyen de la purification, 80%; facteur de purification en moyenne 18. Concentration maximum cent fois. Ainsi on a effectué des préparations avec une concentration délibérément variable entre 10—200 U.C./ml.

Le contrôle de la détoxification a été répété sur les produits concentrés et purifiés (en répétant les épreuves indiquées plus haut) afin de mettre en évidence une éventuelle réapparition de la toxicité. Lorsqu'on constate la réapparition de traces de toxicité dans le produit concentré, on les éloigne en formolant à nouveau 0,5—1‰ et en maintenant 3—10 jours à 37°. Les préparations étaient ensuite adsorbées en parties égales sur suspension de phosphate d'aluminium, contenant 16 mg/ml.

2. *Mode d'immunisation:* Le produit adsorbé a été inoculé comme suit:
— aux souris blanches de 18—20 g, par 0,1—0,5 ml. i.m. dans la cuisse
— aux cobayes de 350—450 g, par 0,5—1 ml i.m. dans la cuisse
— aux lapins de 2500—3500 g, par 0,5—1 ml i.m. dans la cuisse
— aux moutons de 35—40 kg par 0,5 - 1 ml i.m. dans la région périanale dépourvue de poils.

Chaque animal a reçu par 3 injections à intervalles de 3 semaines; pour établir les titres antitoxiques obtenus après la 1-e et 2-e injection on les saigne au moment de la 2-e et 3-e inoculation et ensuite 3 semaines après la 3-e injection, pour établir la réponse immunologique à cette dernière. Les saignées ont été faites par groupes aux souris et individuellement aux autres animaux.

3. *Méthodes de titrage et appréciation des résultats:*

*a)* L'activité léthale de la toxine native a été déterminée par la D.L.M$_{50}$. sur souris blanches de 16—18 g — par inoculation intraveineuse, en utilisant deux animaux pour chaque dilution.

*b)* Le pouvoir de combinaison de la toxine a été titré « in vitro » par la réaction de la lécithinase.

*c)* Le pouvoir de combinaison de l'anatoxine a été de même titré « in itro » avec lécitho-vitelline, par adaptation de la méthode de BÄCHER, KRAUS et ÖWENSTEIN.

*d)* Le titrage de l'antitoxine dans le sang a été exécuté « in vitro », utilisant réaction avec lécitho-vitelline pour les sérums à titre dépassant 0,5 U.A./ml : la réaction d'hémolyse aux sérums à titres réduits, afin d'éviter le phénomène 'inhibition non-spécifique (30).

*e)* La résistance à la toxine a été appréciée par voie intrapéritonéale chez cobaye et chez la souris par voie intraveineuse, utilisant une toxine séchée vec une D.L.M., établie séparément pour chaque espèce.

*f)* La résistance à l'infection a été testée en injectant par voie intramuscu- ire une suspension en sérum physiologique de spores (dans laquelle les formes égétatives avaient été tuées par la chaleur), mélangée en parties égales avec du ılorure de calcium 25%. La D.C.L. de la suspension de spores a été préala- ement déterminée sur des animaux non-immunisés.

## RÉSULTATS

On a utilisé 15 lots d'anatoxine, immunisant plus de 1000 souris blanches, ; lapins, plus de 160 cobayes et 20 moutons.

1. *Immunisation des souris blanches.* On a formé 39 groupes d'animaux ar 15—70) qui ont reçu entre 0,75—32,5 U.C. par injection, administrées ns la grande majorité des cas en volume de 0,1 ml et seulement à quelques ts en volume de 0,5 ml.

a) *Relation entre la qualité de l'antigène et la réponse immunologique.* On peut ivre cette relation dans le tableau I, où les souris immunisées ont été partaes en trois groupes, selon le nombre des U.C. injectées.

*Tableau I*

**lation entre la qualité de l'antigène inoculé et la réponse immunologique chez les souris immunisées antiperfringens**

| U. C. injectées | Réponse immunologique en titres moyens antitoxiques | | |
|---|---|---|---|
| | *Inj. I* U.A./ml sérum sanguin | *Inj. II* U.A./ml sérum sanguin | *Inj. III* U.A./ml sérum sanguin |
| 0,75— 4 | 0,4 | 0,64 | 1,65 |
| 5 —15 | 0,51 | 1,1 | 2,18 |
| 32, 5 | 1 | 1,66 | 3 |

Du tableau I il ressort que la plus grande différence entre les réponses mmunologiques des groupes se constate après la première inoculation, l'augmen- tion du nombre de U.C. administrées, conduisant à une hausse du titre anti- toxique moyen obtenu.

Par la répétition des inoculations, ces différences se réduisent de plus en plus les titres moyens tendant à une égalisation. Nous remarquons que les animaux du 3-ème groupe, qui ont reçu un nombre plus grand de U.C. (32,5) ont eu un titre moyen élevé (1 U.A./ml sérum sanguin) même après la première injection.

b) *Relation entre le nombre d'injections et la réponse immunologique.* On constate une augmentation nette du titre antitoxique, en fonction du nombre d'injections administrées. La moyenne des titres antitoxiques sanguins de tous les animaux a été de 0,73 U.A./ml après la première injection, 1,08 U.A./ml après la seconde et 2,66 U.A./ml après la troisième.

L'augmentation du titre toxique moyen est rapportée dans le graphique 1.

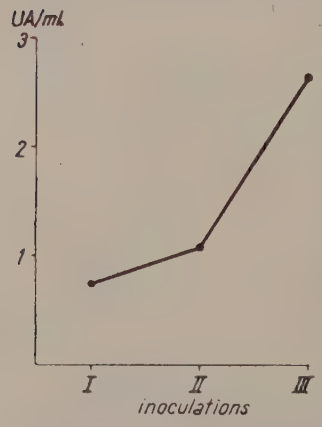
c) *Relation entre le titre antitoxique et la résistance à l'intoxication.* Cette relation est exprimée dans le tableau II.

*Tableau II*

**Résistance des souris immunisées antiperfringens à la toxine homologue en fonction du titre antitoxique sanguin**

| Titre antitoxique U.A./ml sérum sanguin | Proportion vis-à-vis du total — souris immunisées | Résistance à la toxine | |
|---|---|---|---|
| | | 5 D.L.M. | 10 D.L.M |
| $>0{,}5 \quad < 2$ | 58% | 38% | 36% |
| $>2 \quad \leqslant 5$ | 37% | 62% | 50% |
| $>5 \quad \leqslant 10$ | 5% | 72% | —*) |

*) — : n'a pas été effectuée




*Graph.* 1. — Évolution de la moyenne des titres antitoxiques sanguins chez les souris immunisées avec de l'anatoxine perfringens, en fonction du nombre des inoculations

Du tableau II on constate que le pourcentage des souris résistantes à la toxine est directement proportionnel au titre antitoxique. et qu'il n'y a pas eu de différence nette entre la résistance à 5 et à 10 D.L.M. toxine.

De la totalité des souris intoxiquées, à titres antitoxiques sanguins de $> 0{,}5 - > 5 < 10$ U.A./ml, 46% ont résisté à 5—10 D.L.M. toxine, 50% à 5 D.L.M. et 42% à 10 D.L.M. [1]).

2. *Immunisation des cobayes.* On a immunisé plus de 160 cobayes, en administrant par 0,5—1 ml anatoxine concentrée, purifiée et adsorbée, qui contenait entre 7,5—70 U.C.

a) *Rôle de la qualité de l'antigène.* Le tableau III montre l'évolution du titre antitoxique chez le cobaye, en fonction de la qualité d'antigène injecté.

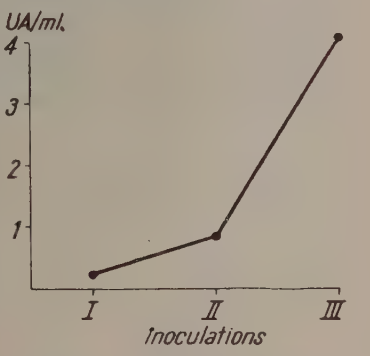
[1]) Il est probable que le pourcentage de résistance, eut été plus grand si les animaux avaient été inoculés avec 1—2 D.L.M.

*Tableau III*

**volution du titre antitoxique sanguin chez les cobayes immunisés antiperfringens en fonction de la qualité de l'antigène inoculé**

| U. C. injectées | Titre antitoxique sanguin en U.A./ml sérum | | |
|---|---|---|---|
| | Inj. I | Inj. II | Inj. III |
| 7,5—20 | 0,12 | 0,51 | 4,68 |
| 32,5—40 | 0,31 | 1 | 3,91 |
| 50 —70 | 0,67 | 1,3 | 3,52 |

Comme on peut le constater — dans les limites des variations présentées ar nos groupes— il n'y a pas de relation entre le nombre des U.C. administrées : la réponse immunologique qu'après la première et surtout après la seconde jection d'anatoxine. Ainsi, l'on peut observer airement après la seconde injection, que les roduits contenant au moins 30 U.C. par ose, favorisent l'obtention d'un titre moyen au moins 1 U.A./ml sérum sanguin. En change, après la troisième injection, on ne eut plus constater une relation entre le nom- re d'U.C. administrées et le titre antitoxique, s titres étant presque équivalents chez tous s groupes, ce qui démontre que la répéti- on du nombre d'inoculations compense les fférences de valeur des anatoxines perfrin- ns, fait constaté aussi par d'autres auteurs 0, 31).




*Graph.* 2. — Évolution de la moyenne des titres antitoxiques chez les cobayes immunisés avec de l'anatoxine perfringens, en fonction du nombre des inoculations.

b) *Évolution du titre antitoxique en fonction de la répétition du stimulus antigénique.* On a u constater une augmentation continue du re antitoxique en fonction du nombre des jections d'anatoxine, tant pour chaque animal parément qu'en moyenne générale. Après première injection le titre moyen a été de 26 U.A./ml sérum sanguin, avec des limites entre 0,05 et $> 1 < 2$ U.A./ml, près la seconde injection, le titre moyen a été de 0,92 U.A./ml, avec des nites entre $> 0{,}05 < 0{,}1$ et $> 2 < 5$ U.A./ml et après la troisième injec- on la moyenne a été de 4,05 U.A./ml sérum sanguin, avec des limites tre $> 0{,}1 < 0{,}5 — > 20$ U.A./ml. En ce qui concerne le titre minimum otecteur — 0,1 U.A./ml — il a été obtenu en proportion de 81—85% après première et seconde injection et en proportion de 100% après la troisième. évolution du titre antitoxique moyen au cours de l'immunisation est pré- ntée dans le graphique No. 2.

c) *Relation entre la résistance à la toxine ou infection et le titre antitoxique.* ur mieux apprécier cette relation et le degré de protection conféré par l'immu- sation, il faut présenter en premier lieu (tableau IV) les variations du titre titoxique chez le cobaye, après trois injections d'antigène.

*Tableau IV*

**Variations du titre antitoxique chez les cobayes immunisés antiperfringens après *3* inoculations d'antigène**

| Titre U.A./ml sérum sanguin | Pourcentage du total | Titre U. A./ml sérum sanguin | Pourcentage du total |
|---|---|---|---|
| $>0{,}1$ $<0{,}5$ | 15,1% | $\geqslant 5<10$ | 11,7% |
| $\geqslant 0{,}5$ $<1$ | 12,8% | $\geqslant 10-15$ | 8,1% |
| $\geqslant 1$ $<2$ | 20,9% | $\geqslant 20$ | 5,8% |
| $\geqslant 2$ $<5$ | 25,6% | | |

Il résulte du tableau III que la majorité des animaux (84,9%) ont présenté un titre antitoxique élevé (entre 0,5 et 20 U.A./ml, sérum sanguin) et seulement 15,1% ont présenté le titre de 0,1 U.A./ml, titre à la limite protectrice inférieure.

Une partie des cobayes ont subi l'intoxication avec un nombre variable de D.L.M. La relation entre les titres antitoxiques sanguins et la résistance à la toxine est représentée dans le tableau V.

*Tableau V*

**Résistance des cobayes immunisés antiperfringens à la toxine homologue en fonction du titre antitoxique sanguin**

| Titre antitoxique U.A./ml sérum sanguin | Quantité toxine injectée D.L.M. | Résistance en % |
|---|---|---|
| $>0{,}1<0{,}5$ | 2 | 72% |
| $\geqslant 0{,}5<1$ | 5 | 75% |
| $\geqslant 1-15$ | 5—50 | 100% |
| $>20$ | 100 | 50% |

Ce tableau indique une étroite relation entre le titre antitoxique sanguin et la résistance à la toxine. Le groupe des cobayes au titre le plus faible ($>0{,}1<0{,}5$) présente une résistance de 72% à 2 D.L.M., tandis que les cobayes au titre entre $>1-15$ U.A./ml résistent en proportion de 100%, même à des doses entre 5 et 50 D.L.M.; cependant à 100 D.L.M., seulement 50% résistent, même à un titre très élevé — $>20$ U.A./ml sérum sanguin. Au total, 80% des cobayes intoxiqués ont résisté à des doses entre 2—100 D.L.M.

Dans le tableau VI on présente les résultats de l'infection des cobayes par la suspension de spores dans du chlorure de calcium, en rapport avec le titre antitoxique sanguin. On peut également observer, dans ce cas, une dépendance stricte de la résistance du titre antitoxique.

Le groupe de cobayes aux titres de $>0{,}1<0{,}5$ U.A./ml présente une résistance plus réduite, soit 60% à 2 D.C.L. spores. Le reste de cobayes avec des titres d'au moins 0,5 U.A./ml présente une résistance de presque 95% à

*Tableau VI*

**ésistance des cobayes immunisés antiperfringens à l'infection avec spores de Cl. perfringens en fonction du titre antitoxique sanguin**

| Titre antitoxique U.A./ml sérum sanguin | D.C.L. Spores injectées | Résistance en % |
|---|---|---|
| >0,1 < 0,5 | 2 | 60% |
| >0,5 < 2 | 2—5 | 100% |
| >1 < 2 | 10 | 75% |
| >1 < 5 | 5—50 | 100% |
| >2 < 5 | 10—50 | 75—90% |
| >5 >20 | 50—250 | 100% |

es doses de spores allant de 2 D.C.L. jusqu'au chiffre considérable de 250 .C.L. Au total, 90% des cobayes, ayant subi l'épreuve de l'infection dans es conditions difficiles à supporter — avec des spores en solution de chlorure e calcium —, ont résisté à 2 jusqu'à 250 D.C.L.

Nous devons remarquer que, même les cobayes qui n'ont pas résisté, ont ırvécu 10—23 jours, tandis que les témoins, qui ont reçu seulement 1 D.C.L., ɔnt morts pour la plupart en 1—4 jours.

De même, il est à signaler qu'une série de cobayes à titres antitoxiques ifférents et injectés avec des quantités diverses de spores, ont présenté des ıfections locales spécifiques avec *Cl. per-ingens*, qui se sont prolongées quelques maines et, en grande majorité, ont guéri ɔrès évacuation répétée du contenu puru-nt des abcès. Dans une autre communi-ıtion on discutera à fond la signification nmunologique de la transformation de l'in-ction gangréneuse, dans une infection pyo-ène localisée, qui intervient dans les condi-ons de l'organisme immunisé activement. our le moment, nous signalons seulement caractère bénin de ces infections, quoiqu'on t isolé en permanence de la plaie, des *bacilles erfringens* de forte toxicité.

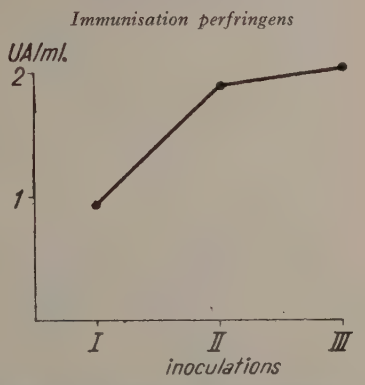



*Fig.* 3. — Évolution de la moyenne des titres antitoxiques sanguins chez les lapins immunisés avec de l'anatoxine perfringens, en fonction du nombre des inoculations

3. *Immunisation active des lapins.* On a nmunisé 25 lapins par trois injections de 2,5—65 U.C., administrées en quantités de ,5—1 ml.

On peut suivre dans le graphique 3 l'évo-ıtion du titre antitoxique sanguin, en fonction u nombre d'injections administrées. Contrairement aux souris et cobayes, s lapins répondent immédiatement au stimulus, dès la première injection, ascension du titre antitoxique étant ensuite significative après la seconde jection, mais insignifiante après la troisième. Les titres antitoxiques sanguins ıoyens sont: 0,96 U.A./ml, après la première injection, 1,92 U.A./ml après la conde, et 2,01 U.A./ml après la troisième.

Du tableau VII, il ressort que l'on ne peut mettre en évidence une différence nette entre les effets immunologiques obtenus avec différentes concentrations de U.C. Même après la première injection, — indifféremment de la concentration en U.C. — tous les animaux dépassent le titre antitoxique minimum protecteur, les lots présentant des titres moyens dans des limites rapprochées — 0,75 — 1,35 U.A./ml.

4. *Immunisation active des moutons.* On a immunisé 20 moutons par trois injections d'anatoxine, contenant 32,5 – 65 U.C., respectivement 0,5 – 1 ml de produit adsorbé.

Après la dernière injection de la primo-immunisation, on a continué à poursuivre l'évolution du titre par récolte des épreuves et titrages individuels des sérums, chaque deux semaines, pendant trois mois. Après cette période,

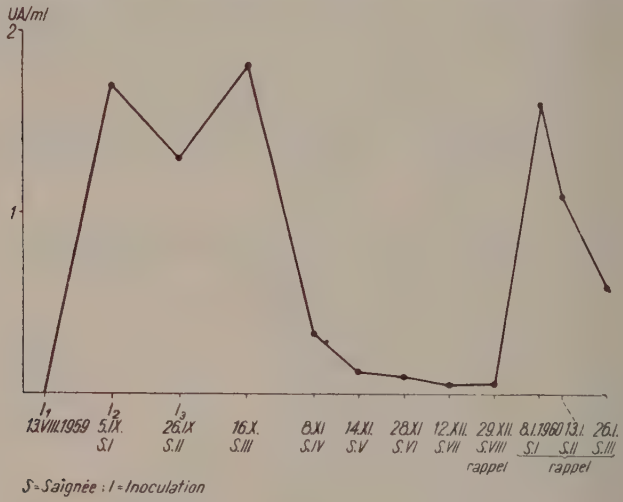



*Fig.* 4. — Évolution de la moyenne des titres antitoxiques sanguins au cours de la primo-immunisation, dans la période suivante et après rappel, chez les moutons immunisés avec de l'anatoxine perfringens.

on a fait une injection de rappel dans les mêmes conditions et avec les mêmes antigènes, comme pour la primo-immunisation, poursuivant ensuite l'évolution de la réponse immunologique à 10, 15 et 30 jours. Les titrages ont été faits par lécitho-vitelline et hémolyse, à l'exception d'une période dans laquelle le titrage par lécitho-vitelline n'a pas été effectué, les titres étant trop bas.

Le tableau VIII et le graphique No. 4 indiquent l'évolution des titres au cours de la primo-immunisation et après rappel.

On peut constater du tableau VIII, sous une forme encore plus accentuée que chez les lapins, que les animaux ont répondu immédiatement au stimulus antigénique, après la première injection, en échange, on n'a pas enregistré l'augmentation du titre après la II-e et la III-e injection, ce qui résulte avec plus d'évidence du graphique 4.

*Tableau VII*

**ıriation des titres antitoxiques sanguins chez les lapins immunisés antiperfringens en fonction de la qualité et quantité d'antigène injecté**

| U. C. inject. | Quantité ml | Titres antitoxiques (U.A./ml sérum sanguin) après injection. | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | I | | II | | III | |
| | | Moyen | Limite | Moyen | Limite | Moyen | Limite |
| 12,5 | 0,5 | 0,95 | >0,5<1—>1<2 | 1,05 | >0,5< 1— 2 | 1,62 | 1—>1<2 |
| 30 | 1 | 0,75 | >0,5<1— 1 | 1,5 | 0,5— 2 | 2,9 | 2— 5 |
| 32,5 | 0,5 | 1,35 | >0,5<1— 2 | 4,3 | 2—>5<10 | 1,25 | >0,5<1—2 |
| 40 | 0,5 | 0,95 | >0,5<1—>1<2 | 1,12 | 1—>1< 2 | 1,35 | 1—>1<2 |
| 65 | 1 | 0,8 | >0,5<1— 1 | 1,5 | >0,5< 1— 2 | 2,75 | 2— 5 |
| Moyenne de tous les animaux immunisés | | 0,96 | >0,5<1— 2 | 1,92 | >0,5<1— >5<10 | 2,01 | >0,5<1—5 |

*Tableau VIII*

**volution de la moyenne des titres antitoxiques sanguins chez les moutons immunisés antiperfringens pendant la primo-immunisation et après l'injection de rappel**

| Méthode de Titrage | Titres moyens sanguins (U.A./ml sérum) après les injections: | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | 15 jours | 30 jours | 45 jours | 60 jours | 75 jours rappel | 10 jours | 15 jours | 30 jours |
| Hem. | 1,7 | 1,3 | 1,8 | 0,35 | 0,14 | 0,09 | 0,06 | 0,06 | 1,6 | 1,1 | 0,6 |
| L. V. | 2,1 | 1,3 | 1,9 | 0,52 | — | — | — | — | 1,7 | 1,3 | — |

Dès la première injection, tous les animaux présentent un titre protecteur inimum (au moins 0,2 U.A./ml, réaction de l'hémolyse), quelques animaux teignant des titres de $> 2 < 5$ U.A./ml et même $> 5 < 10$ U.A./ml sérum nguin.

De même, en comparant les valeurs antitoxiques sanguines obtenues par s deux variantes de volume et U.C. de l'antigène introduit, il n'y a eu aucune ifférence apparente, en ce qui concerne la réponse immunologique.

Le rappel produit une hausse de presque 30 fois du titre moyen après 0 jours, suivie d'une diminution légère après cinq autres jours et d'une diminution plus accentuée après les quinze jours suivants (Fig. 4).

L'évolution du titre antitoxique de ces animaux continuera à être poursuivie.

★

Avant de passer à la discussion des résultats, nous soulignons qu'à part formation de nodules de dimensions variables et se résorbant en quelques ours ou semaines, on n'a observé d'autres réactions locales ou générales chez ucune des espèces d'animaux injectés.

## DISCUSSION

Les résultats de nos recherches sont comparables à ceux indiqués par les auteurs d'autres pays. Nous rappelons ainsi qu'en ce qui concerne les souris, TYTELL et coll. (10) obtiennent une résistance « excellente » des animaux immunisés envers 5 $LD_{50}$ toxine et « bonne » envers 10, 20, 50 $LD_{50}$ toxine. VOLKOVA et ZELEVINSKAIA (13) obtiennent la résistance des souris immunisées à 2 reprises par 15 U.C. et qui avaient un titre toxique sanguin dépassant 2 U.A./ml, à 50 D.C.L. toxine et 5 D.C.L. culture. Les auteurs cités ne précisent pas le pourcentage des animaux résistants. LETTL et coll. (17) obtiennent, après avoir administré aux souris, par voie intrapéritonéale 1—50 U.C. — une résistance de 0—100% à 1—10 D.L.M. ou de 10—14% à 15—50 D.L.M. Les auteurs ne précisent pas le nombre des injections administrées.

Si les souris que nous avons inmunisées ont présenté un titre moyen général de 1,08 U.A./ml sérum après deux injections et 2,66 U.A./ml après trois injections (lorsque, comme il a été indiqué, les souris ont résisté en proportion de 46% à 5—10 D.L.M. toxine), en échange, les animaux ayant reçu 32,5 U.C. en 0,5 ml, ont eu, après trois injections, des titres de 1—5 U.A./ml, résistant en proportion de 50% à 5—10 D.L.M.

A titre comparatif, nous rappelons que des tableaux présentés par LETTL et coll., il résulte que les lots de souris qui avaient reçu 20—50 U.C. résistèrent en proportion de 65—100% à 10 D.L.M. toxine.

De très bons résultats furent obtenus chez les cobayes. À part le titre antitoxique sanguin qui monte après deux injections à une moyenne de 0,92 U.A./ml et après trois injections à une moyenne de 4,05 U.A./ml, on a obtenu une forte résistance en proportion élevée (80%) à 2—100 D.L.M. toxine et en proportion de 90% à 2—250 D.C.L. spores. TYTELL et coll. (10) obtiennent de très bons titres antitoxiques sanguins après deux injections et une résistance à 5,10 et 20 D.L.M. toxine et à 10—1000 D.L.M. culture. Selon ces auteurs, les titres antitoxiques sanguins de $> 0{,}1$ U.A./ml protègent 100% des animaux contre la toxine ou la culture homologue (dans notre expérience les chiffres sont de 80% pour la toxine et respectivement 90% pour la suspension de spores).

À cette occasion, nous devons remarquer que la méthode d'injecter une suspension de spores en chlorure de calcium—utilisée par nous — représente la voie d'infection la plus sévère, vu que lorsqu'on utilise l'infection par culture, une partie de la D.L.M. est constituée par la toxine préformée, qui peut être neutralisée immédiatement par l'antitoxine circulante *).

ALTEMEIER et coll. (11) obtiennent chez le cobaye, après trois injections d'anatoxine perfringens, des titres de 0,05—20 U. A./ml sérum sanguin et une résistance à 10—100 D.L.M. culture, administrée dans le muscle écrasé, additionnée de poudre stérile; la résistance était en proportion de 90%—100% en cas d'immunisation pratiquée par voie intramusculaire et de 60—70% par voie souscutanée. VOLKOVA et ZELEVINSKAIA (13) obtiennent — chez les cobayes vaccinés par deux doses de 25—40 U.C. des titres antitoxiques dépassant 0,1 U.A./ml

*) Ces affirmations sont appuyées aussi par le fait qu'en cas d'infection avec culture perfringens 1 D.C.L. est constitué, généralement, de dizaines ou centaines de millions de germes, tandis que dans notre cas, la dose certe léthale pour les témoins — D.C.L. était constituée seulement de 1—5 spores.

une résistance à 1 D.C.L. culture et 1—2 D.L.M. toxine, et après revaccination à 6 mois, des titres de 0,5—1 U.A./ml sérum et une résistance à 1--5—10 C.L. culture.

MANOLOV, VRANCEVA et DENCEV (16), après avoir administré à des cobayes ois fois par 50—100 U.C., obtiennent une résistance de 58—73% envers )—20 doses léthales de toxine.

Les résultats obtenus par nous chez les lapins diffèrent de ceux des autres iteurs — ainsi, VOLKOVA et ZELEVINSKAIA (13) obtiennent une hausse progresve du titre antitoxique chez cette espèce (comme chez les souris et les cobayes), ndis que, dans notre cas, les lapins — ainsi que les moutons *) répondent ifféremment des souris et cobayes au stimulus antigénique et notamment par ne élévation brusque du titre antitoxique au premier stimulus, et plus faible u nulle aux stimulus ultérieurs. D'après nos données, il s'agit donc de deux ypes de réactivité des espèces animales expérimentées.

En poursuivant l'évolution des titres antitoxiques chez les moutons après primo-immunisation pendant trois mois, on peut encore enregistrer les premiers eux mois un niveau antitoxique sanguin satisfaisant ($\geqslant$ 0,1 U.A./ml) chez lus de 50% des animaux.

Quoique cette espèce d'animaux réponde peu favorablement à l'entier cycle e la primo-immunisation, l'injection de rappel a néanmoins déterminé une ausse du titre moyen de presque 30 fois. Le résultat est comparable à celui bservé par VOLKOVA et ZELEVINSKAIA (13) chez une espèce sensible (lapins), nsi que par ADAMS (9) et TYTELL et coll. (10) chez une espèce peu sensible, homme, ce qui nous fait espérer de pouvoir réaliser à l'avenir des résultats milaires à ceux obtenus par ces auteurs.

D'ailleurs, en général, les résultats que nous venons d'obtenir, par analogie ceux des autres auteurs, basés sur des données expérimentales similaires — ous font espérer de réaliser l'immunisation active anti-perfringens de l'homme, tilisant un produit combiné, la polyanatoxine.

Nos résultats laissent encore ouvert le problème du rôle de la qualité et la uantité d'antigène concentré et purifié, quoiqu'il semble qu'une concentration un volume antigénique plus grands, donnent de meilleurs résultats, surtout ux premières injections.

RÉSUMÉ

1. On a réalisé l'immunisation expérimentale des animaux de laboratoire vec des anatoxines perfringens concentrées, purifiées et adsorbées, sur phosphate 'aluminium. Les anatoxines natives, résultant des toxines natives avec 3—8 .C./ml et 300—500 D.L.M./ml ont eu 2—4 U.C./ml. Par purification et oncentration avec acide métaphosphorique, on a obtenu des anatoxines contenant jusqu'à 200 U.C./ml qui ont été adsorbées en parties égales sur une suspension de phosphate d'aluminium de 16 mg/ml.

2. On a immunisé avec ces préparations plus de 1000 souris, plus de 160 obayes, 25 lapins et 20 moutons, obtenant après trois injections — à trois emaines d'intervalle — des titres antitoxiques sanguins de $> 0{,}5 <$ 1—

*) Pour cette espèce nous n'avons pas trouvé dans la littérature des données pour les omparer à nos résultats.

$> 5 < 10$ U.A.ml., en moyenne 2,66 U.A./ml chez les souris; $> 0{,}1 < 0{,}5 - > 20$ U.A./ml., en moyenne 4,05 U.A./ml chez les cobayes; $> 0{,}5 < 1 > 2 < 5$ en moyenne 2,01 U.A./ml chez les lapins et $> 0{,}5 < -1 - > 3$, en moyenne 1,92 U.A./ml chez les moutons.

On constate, chez les moutons, que le titre antitoxique se maintient protecteur chez plus de 50% des animaux pendant deux mois. Après trois mois, une injection de rappel produit une augmentation d'environ 30 fois le titre moyen antitoxique, qui se maintient à un niveau satisfaisant jusqu'à 30 jours après rappel.

Les souris immunisées ont résisté en proportion de 46% à 5—10 D.L.M. toxine, et les cobayes en proportion de 80% à 2—100 D.L.M. toxine et 90% à 2—250 D.C.L. spores, administrées en solution de chlorure de calcium.

Aucune réactivité locale ou générale n'a été observée, à part un petit nodule au point d'injection, résorbé progressivement en quelques semaines.

3. En ce qui concerne leur réactivité à l'antigène perfringens, on constate que les espèces animales peuvent être partagées en deux types, les souris et les cobayes donnent une réponse relativement faible au premier stimulus et progressive aux stimuli suivants; les moutons et les lapins répondent favorablement au premier stimulus, la réactivité étant la même ou en légère progression aux stimuli ultérieurs.

4. Les résultats expérimentaux obtenus, justifient l'espoir de réaliser l'immunisation active anti-perfringens de l'homme.

BIBLIOGRAPHIE


1. Cernaia L. A. et Kovtunovici G. P. — « Gazovaia Infekţiia », Gosmedizdat U.S.S.R., Kiev, 1950.
2. Dible J. H., MacLennan J. D. et Barber M. — « Recent advances in bacteriology » III-d ed., London, 1951.
3. Evans D. G. — Brit. Jour. Exp. Path., 1943, **24,** 81.
4. Evans D. G. — Jour. Path. a. Bact., 1943, **55,** 427.
5. Evans D. G. — Brit. Jour. Exp. Path., 1947, **28,** 24.
6. Vîgodcikov G. V., Volkova Z. M., Zelevinskaia S. A. et Larina I. A. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol.. 1957. No 10, 120.
7. Bernheimer A. — Jour. Immunol., 1947, **56,** 317.
8. Tytell A. A. et coll. — Jour. Bact., 1946, **51,** 621.
9. Adams M. H. — Jour. Immunol., 1947, **56,** 323.
10. Tytell A. A. et coll. — Jour. Immunol., 1947, **55,** 233.
11. Altemeier W. A. et coll. — Arch. Surg. (Chicago) 1952, **65,** 633.
12. Markovici A. V. et Haustova I. M. — Biull. Eksp. Biol. Med., 1954, **9,** 50.
13. Volkova Z. M., et Zelevinskaia S. A. — J. Mikro: iol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957, No 4, 77.
14. Alîmov A. Ia., Krijanovski G. N. et Pevnitki L. A. — Biull. Eksp. Biol. Med., 1957, **5,** 100.
15. Sneerson A. N. — « Anaerobnîe Infekţii », Gosmedizdat U.S.S.R., Kiev., 1957, 61, 67.
16. Manolov D., Vranceva S. et Dencev V. — Communication au « Symposium International d'Immunologie », Opatija, 1959.
17. Lettl A. et coll. — Idem.
18. Zelevinskaia S. A. et Volkova Z. M. — « Assoţiirovannîe profilakticeskie preparatî protiv ranevîh infekţii », Moskva 1959, 91—101.
19. Marmalevskaia L. Ia. — Idem, 101.
20. Marmalevskaia L. Ia. — Idem, 221.
21. Vinogradova I. N. et coll. — Idem, 221.
22. Vinogradova I. N. et coll. — Idem, 229.
23. Vîgodcikov G. V. — Idem, 237.
24. Cerkas G. P. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1958, No 7, 60.

5. Cerkas G. P. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1959, No 9, 90.
6. Bittner J. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1958, 17, 417.
7. Kranzdorf H. et Bittner J. — Arch. Roum. de Path. Exp. e de Microbiologie, 1958, 17. 427
8. Bittner J. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1959, 18, 49.
9. Bittner J. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1959, 18, 181.
0. Oakley C. L., et Warrack G. H. — Journ. Path. a Bact., 1941, 53, 335.
1. Haliapina K. T. et Roşkovskaia M. M. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1950, No 2, 3.

## ИЗУЧЕНИЕ АНАЭРОБНОГО ПОЛИАНАТОКСИНА

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АКТИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ АНАТОКСИНОМ ПЕРФРИНГЕНС КОНЦЕНТРИРОВАННЫМ ОЧИЩЕННЫМ И АДСОРБИРОВАННЫМ НА ФОСФАТЕ АЛЮМИНИЯ.

### КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Проведена экспериментальная иммунизация лабораторных животных анатоксинами ерфрингенс, концентрированными, очищенными и адсорбированными на фосфате алюминия. Нативные анатоксины, происходящие из нативных токсинов, содержащие 3 –8 С/мл и 300—500 М.Л.Д./мл, содержали 2—4 ЕС/мл. Путем очистки и концентрирования при помощи метафосфорной кислоты, получены анатоксины, содержащие 10—200 С/мл, которые адсорбировались на равном количестве взвеси фосфата алюминия, содержащей 16 мг/мл.

2. При помощи полученных препаратов иммунизировали свыше 1000 мышей, свыше 0 морских свинок, 25 кроликов и 20 овец; после трехкратных прививок с интервалами 3 недели получены следующие титры антитоксина в крови: > 0,5 < 1— > 5 <10 АЕ/мл среднем, 2,66 АЕ/мл у мышей, > 0,1 < 0,5 — > 20АЕ/мл, в среднем 4,05 АЕ/мл у морских свинок, >0,5< 1 — >2<5, в среднем 2,01 АЕ/мл у кроликов и >0,5< 1—>3, в среднем 1,92 АЕ/мл у овец.

Установлено, что антитоксический титр, обеспечивающий защиту, сохраняется у ыше 50% овец в течении 2 месяцев. После 3 месяцев возобновительная прививка вызыет почти 30 — и кратное повышение антитоксического титра, сохраняющегося на удовлетрительном уровне в течении 30 дней от ревакцинации.

Иммунизированные мыши выжили в 46% после введения 5—10 М.Л.Д. токсина; ммунизированные свинки выжили в 80% после введения 2—100 М.Л.Д. токсина и в 0% после введения 2—250 Д.С. споров, введенных в растворе хлористого кальция.

Не отмечены местные или общие реакции, кроме небольших узелков на месте введения, степенно рассасывающихся в течении нескольких недель.

3. Установлено, что виды животных принадлежат к двум различным типам реактивности по отношению к антигену перфрингенс: мыши и морские свинки отвечают относительно слабо на первый стимул и постепенно лучше к дальнейшим стимулам, в то время к овцы и кролики отвечают хорошо на первый стимул, но остаются на том же уровне или лучшают ответ в небольшой степени после дальнейших стимулов.

4. Полученные экспериментальные результаты дают надежду в отношении возможсти осуществить активную иммунизацию анти-перфрингенс у людей.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER EIN POLYANAEROBENTOXOID

### EXPERIMENTELLE AKTIVE IMMUNISIERUNG MIT EINEM KONZENTRIERTEN, GEREINIGTEN UND AN ALUMINIUMPHOSPHAT ADSORBIERTEN PERFRINGENSTOXOID.

### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Es wurde eine experimentelle Immunisierung von Laboratoriumstieren mit konntrierten, gereinigten und an Aluminiumphosphat adsorbierten Perfringenstoxoiden durchführt. Die nativen, aus nativen Toxinen mit einem Gehalt von 3—8 Lb/ml und 300—800 LM/ml gewonnenen Toxoide enthielten 2—4 KE/ml. Durch Reinigung und Konzenerung mit Metaphosphorsäure wurden Toxoide mit einem Gehalt von 10—200 Lb/ml wonnen, die in gleichen Teilen an eine Aufschwemmung von Aluminiumphosphat 6 mg/ ml) adsorbiert wurden.

2. Mit diesen Präparaten wurden über 1000 Mäuse, über 160 Meerschweinchen, 25 aninchen und 20 Schafe immunisiert. Nach 3 Einspritzungen in Abständen von 3 Wochen

wurden folgende Antitoxintiter im Blut erzielt: bei Mäusen, von Minimalwerten zwischen 0,5 und 1 bis zu Maximalwerten zwischen 5 und 10 AE/ml, mit einem Mittelwert von 2,66 AE/ml; bei Meerschweinchen, von Minimalwerten zwischen 0,1 und 0,5 bis zu Maximalwerten von über 20 AE/ml, mit einem Mittelwert von 4,05 AE/ml; bei Kaninchen, von Minimalwerten zwischen 0,5 und 1 bis zu Maximalwerten zwischen 2 und 5 AE/ml, mit einem Mittelwert von 2,01 AE/ml; bei Schafen, von Minimalwerten zwischen 0,5 und 1 bis zu Maximalwerten von über 3 AE/ml, mit einem Mittelwert von 1,92 AE/ml.

Bei Schafen erhielt sich ein schutzverleihender Antitoxintiter bei 50% der Tiere, während einer Zeitspanne von 2 Monaten. Nach 3 Monaten, rief eine neuerliche Einspritzung ein Ansteigen des mittleren Antitoxintiters um fast das dreissigfache hervor. Der Titerspiegel blieb bis zu 30 Tage nach dieser Einspritzung befriedigend.

Von den immunisierten Mäusen widerstanden 46% der Einspritzung von 5—10 DLM Toxin und von den Meerschweinchen, 80% der Einspritzung von 2—100 DLM Toxin und 90% der Einspritzung von 2—250 DCL Sporen in einer Kalziumchloridlösung.

Eine örtliche oder Allgemeinreaktion trat nicht auf, ausser eines kleinen Knötchens am Injektionsort, das im Verlauf von einigen Wochen resorbiert wurde.

3. Es ergibt sich, dass die Tierarten, was die Ansprechbarkeit auf Perfringensantigen anbetrifft, in zwei verschiedene Typen eingeteilt werden können: Mäuse und Meerschweinchen reagieren auf den ersten Antigenreiz verhältnismässig schwach und dann immer stärker auf die folgenden Reize; Schafe und Kaninchen reagieren gut auf den ersten Reiz, jedoch nicht oder nur wenig besser auf die folgenden Reize.

4. Die in diesen Versuchen erzielten Ergebnisse geben zur Hoffnung Anlass, die aktive Perfringensimmunisierung auch beim Menschen durchführen zu können.

## INVESTIGATIONS CONCERNING AN ANAEROBE-POLYTOXOID.

### I. EXPERIMENTAL ACTIVE IMMUNIZATION WITH A CONCENTRATED AND PURIFIED PERFRINGENS TOXOID ADSORBED ON TO ALUMINIUM PHOSPHATE.

SUMMARY

1. Laboratory animals have been experimentally immunized with concentrated purified perfringens toxoids adsorbed on to aluminium phosphate. The native toxoids obtained from native toxins containing 3—8 Lb/ml and 300—500 DLM/ml contained 2—4 Lb/ml. Toxoids containing 10—200 Lb/ml were obtained by purification and concentration with metaphosphoric acid and adsorbed on to equal amounts of an aluminium phosphate suspension containing 16 mg/ml.

2. Over 1000 mice ,160 guinea-pigs, 25 rabbits, and 20 sheep have been immunized with these products. Three inoculations at 3 weeks' intervals were administered. Antitoxin titres in the blood ranged, in mice, from levels between 0.5 and 1 up to levels between 5 and 10 A.U/ml, with an average of 2.66 A.U./ml; in guinea-pigs, from levels between 0.1 and 0.5 up to levels above 20 A.U./ml, with an average of 4.05 A.U./ml; in rabbits, from levels between 0.5 and 1 up to levels between 2 and 5 A.U./ml, with an average of 2.01 A.U./ml; and in sheep, from levels between 0.5 and 1 up to over 3 A.U./ml, with an average of 1.92 A.U./ml.

In sheep, a protecting titre level was maintained for two months in over 50 per cent of the animals. At the end of 3 months, a booster inoculation induces an almost 30 fold increase of the mean antibody titre which persists at a satisfactory level for a period of up to 30 days following the inoculation.

Forty-six per cent of the immunized mice resisted to 5—10 DLM of toxin. Of the immunized guinea-pigs, 80 per cent proved resistant to 2—100 DLM of toxin and 90 per cent to 2—250 DCL of spores administered in a calcium chloride solution.

No local or systemic reactions were recorded, except for small nodules at the site of inoculation, which were gradually resorbed in the course of a few weeks.

3. Animal species were found to belong to 2 types displaying different reactivities versus perfringens antigens: the response of mice and guinea-pigs to the first stimulus is relatively weak and increases progressively following subsequent stimulations, while sheep and rabbits respond well to the first stimulus, but display the same or an only slightly increased degree of responsiveness to subsequent stimuli.

4. The present experimental results justify the hope that a method of active antiperfringens vaccination might be found which could be applied in human subjects.

# RECHERCHES SUR UNE POLYANATOXINE ANAÉROBIE

## . IMMUNISATION ACTIVE EXPÉRIMENTALE AVEC L'ANATOXINE OEDEMATIENS CONCENTRÉE, PURIFIÉE ET ADSORBÉE SUR PHOSPHATE D'ALUMINIUM.

par

A. Olaru, J. Bittner, H. Kranzdorf, Viorica Voinesco et Al. Turburi

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Anaérobies)*

— Manuscrit reçu le 9 mars 1960 —

Pendant la période de la seconde guerre mondiale, la conception sur l'importnce des différents agents pathogènes de la gangrène gazeuse s'est modifiée, accordant au *Cl. œdematiens* la seconde place dans la classification, après le *l. perfringens* (1).

Les recherches plus anciennes d'immunisation active anti-œdematiens, ommencées avant la seconde guerre mondiale, ont continué avec de bons résults (2, 3).

Ces dernières années, une série d'auteurs ont confirmé et amplifié les recherhes, complétant les données qui démontrent le haut degré de la valeur immunnte de l'anatoxine œdematiens (4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14).

Dans le présent travail sont exposés les résultats expérimentaux obtenus relation avec l'anatoxine œdematiens, qui est le troisième composant étudié, ans le but de préparer une polyanatoxine anaérobie. Les résultats de l'étude es anatoxines vibrion septique et perfringens ont été précédemment communiqués (15, 16, 17, 18, 19).

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Anatoxine employée.* a) Milieu de culture: bouillon V. F. — digestion e la viande et foie de veau, avec pepsine en poudre, mélangée au macérat, avec zote aminique final 100—120 mg % a été réparti en récipients de 2—6 litres, vec coton hydrophile, sans viande et glucosé 0,5% avant l'emploi.

b) Souche: *Cl. œdematiens* No. 277 reçue en 1955 de l'Institut Tarasevici, nservée sur bouillon Pope — blanc d'œuf ou bouillon Pope avec gélose 0,1%, élatine 0,4% et fragments de viande. Le passage de 18—24 heures est incorporé proportion de 1% au milieu pour la toxinogénèse.

c) Toxigénèse: après 3—5 jours d'incubation à 37°, la toxine est centrifugée et écantée titrant entre 7.500—20.000 D.L.M./ml, en moyenne 15.000 D.L.M./ml.

d) Détoxification: contrôlée sur la souris par inoculation, devient complète partir de 3—5 jours à 37° pour les toxines formolées 3‰—4‰. L'anatoxine

native obtenue, titrait entre 2 et > 6 U.C./ml, la majorité des lots ayant 5 et au-dessus de 5 U.C./ml.

e) La concentration et purification des anatoxines natives a été effectuée avec l'acide métaphosphorique 20% à pH 3,0, selon une méthode exposée antérieurement (20). Par une concentration de 30—60 fois, et rendement de 70% — 100%, on a obtenu des produits avec 100—250 U.C./ml. Le facteur de purification était égal en moyenne à 12. Les anatoxines concentrées et purifiées, contrôlées à nouveau pour la détoxification, étaient adsorbées en parties égales sur une suspension de phosphate d'aluminium contenant 16 mg/ml.

2. *Technique d'immunisation.* On a administré le produit adsorbé, par voie intramusculaire (cuisse): 0,1—0,5 ml aux souris blanches pesant 18 à 20 g, 0,1—1,0 ml aux cobayes de 350—450 g, 0,1—1,0 ml aux lapins de 2 500—3 500 g, et 0,5—1,0 ml aux moutons de 35—40 kl.

On a pratiqué par 3 injections, à 3 semaines d'intervalle (sauf une partie des souris qui n'ont reçu que 2 injections); au moment de l'administration de la seconde et 3-e injection, les animaux sont saignés afin de déterminer les titres antitoxiques obtenus comme résultat de la première et seconde injection, et 3 semaines après la 3-e injection, pour titrer la réponse immunologique de cette dernière. Les prélèvements de sang ont été faits par groupe aux souris et individuellement aux autres animaux.

3. *Méthodes de titrage et appréciation des résultats.* a) Le titrage de la D.L.M. de la toxine a été fait par inoculation intramusculaire sur des souris pesant 16 — 18 g.

*b)* Le titrage du pouvoir de combinaison de l'anatoxine (U.C.) a été fait « in vivo » sur souris blanches, par adaptation de la méthode de Bächer, Kraus, Löwenstein.

*c)* Le titrage de l'antitoxine sanguine a été effectué « in vivo » sur souris blanches d'après la méthode internationale, utilisant le Lt d'une toxine sèche établie vis-à-vis de 1/50 U.A.I. sérum standard.

*d)* La résistance à la toxine a été établie envers diverses concentrations de toxine sèche, dissoute en solution saline et administrée par voie intraveineuse aux souris et intrapéritonéale aux cobayes.

*e)* La résistance à l'infection a été établie par injection intramusculaire (dans la cuisse) de 0,2 ml, d'une suspension de spores, en solution saline mélangée en parties égales avec une solution de chlorure de calcium 25%.

## RÉSULTATS.

On a utilisé en tout 5 lots d'anatoxine concentrée, purifiée et adsorbée, dont on a immunisé 250 souris, 60 cobayes, 9 lapins et 20 moutons.

1. *Immunisation des souris blanches.* Les souris réparties en 8 lots comprenant 20 à 50 animaux par lot, ont été inoculées deux fois (100 souris) ou 3 fois (150 souris) avec l'anatoxine contenant 1,5—20 U.C. par dose.

La réponse immunologique a été bonne dès la première injection, mais pas totalement satisfaisante, attendu que 3 lots ont eu des titres antitoxiques sous la limite protectrice. En échange, après la seconde et la troisième injection, on a observé une augmentation sensible du titre. Ainsi, les souris ont eu, en général, des titres de < 0,1—0,35 U.A./ml, en moyenne 0,27 U.A./ml après la première

jection, 1,5—15 U.A/ml en moyenne 7,28 U.A./ml après la seconde injection, 3—15 U.A./ml, en moyenne 8,88 U.A./ml après la troisième injection.

On n'a pu constater de relation entre la qualité ou la quantité d'antigène jecté et la réponse immunologique, pas même à la première injection et encore oins aux suivantes.

En ce qui concerne l'évolution du titre au cours de l'immunisation, on onstate un aspect caractéristique, différent de ceux observés dans l'immunisa- on anti-vibrion septique ou anti-perfringens .8, 19) des souris et notamment: un vrai saut u titre antitoxique à la suite de la seconde noculation et un maintien du titre presque u même niveau après (fig. 1), ce qui démontre ue le III-e stimulus antigénique ne serait as nécessaire dans le cas de l'immunisation ntioedematiens. Cette conclusion s'impose ussi du fait que les souris immunisées seu- ment par deux injections ont résisté à l'in- oxication, de même que celles qui ont reçu n stimulus antigénique à 3 reprises.

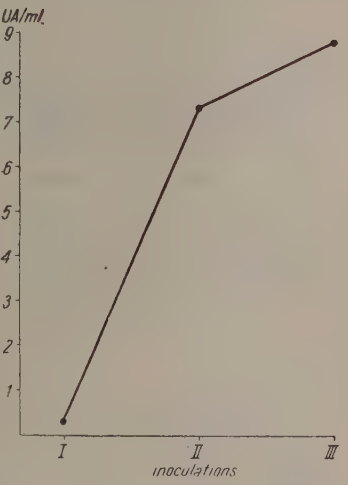



*Fig. 1.* — Évolution de la moyenne des titres antitoxiques sanguins chez les souris immunisées avec l'anatoxine oedematiens, en fonction du nombre d'inoculations.

La résistance à l'intoxication a été très narquée. Il est difficile d'établir une relation ntre le titre antitoxique sanguin et la résis- ance, vu que cette dernière a dépassé 75% ans toutes les variantes expérimentées. En out, les souris ont résisté dans une proportion e 90% à l'intoxication avec 5—50 D.L.M. oxine (nous remarquons qu'un tiers des ouris a été intoxiqué avec 50 D.L.M).

2. *Immunisation des cobayes.* Les cobayes nt reçu 0,1—0,5 ou 1 ml antigène, contenant ntre 4—80 U.C. Les résultats de l'immuni- ation, appréciés par le titre antitoxique ont té exceptionnellement favorables. Après la remière injection, seulement 3 des 10 cobayes ui ont reçu 4 U.C. en dose de 0,1 ml ont eu des titres antitoxiques $< 0{,}1$ U.A./ml érum. Tous les autres ont eu des titres antitoxiques de $0{,}1- > 5 < 10$ U.A./ml. Cependant, après la première injection, on peut constater une différence mar- uée entre les groupes. Ainsi, les groupes qui ont reçu 0,1 ml antigène (4—8 U.C.) nt présenté un titre moyen ne dépassant pas 0,81 U.A./ml, alors que la moyenne les titres des autres cobayes a été de 7 U.A./ml.

Après la seconde injection, les titres ont marqué une augmentation accen- uée, pour atteindre après la troisième injection une moyenne générale de 24,5 U.A./ml, les limites étant entre $> 3 < 5$ et $> 50$ U.A./ml, sans pouvoir faire le distinction entre les groupes en ce qui concerne la quantité ou la qualité de 'antigène injecté.

Il ressort donc qu'aussi bien pour l'immunisation des cobayes ainsi que our celle d'autres animaux, la troisième et éventuellement la seconde injection ne sont pas nécessaires, vu qu'à partir de la première injection même, on peut

obtenir un titre antitoxique protecteur avec la quantité minime de 0,1 ml produit adsorbé, à condition que cette quantité ne contienne pas moins de 8 U.C.

Effectuant la répartition des cobayes immunisés anti-œdematiens par trois injections d'anatoxine adsorbée on peut constater d'après leurs titres antitoxiques (tableau I) que 80% des animaux ont eu plus de 10 U.A./ml sérum sanguin.

Une partie des cobayes, ayant différents titres antitoxiques sanguins ont été soumis au test d'intoxication avec 50—2500 D.L.M. toxine homologue.

*Tableau I*

**Répartion des cobayes immunisés par trois injections d'anatoxine oedematiens d'après leurs titres antitoxiques**

| Titres antitoxiques | pourcentage |
|---|---|
| $> 3 < 5$ | 2,9% |
| $> 5 < 10$ | 17,1% |
| $> 10 < 20$ | 20,0% |
| $> 20 < 50$ | 51,5% |
| $> 50$ | 8,5% |

En général, les cobayes compris dans toute la gamme de titres antitoxiques ($> 3 < 50$) ont résisté en proportion de 100% à 50—500 D.L.M toxine. Si on ajoute aussi les animaux qui présentaient des titres antitoxiques de $\geqslant 20 \geqslant 50$ U.A./ml sérum et qui ont été éprouvés par 1000 ou 2500 D.L.M. la résistance est en général de 83%.

Une partie des cobayes qui ont résisté, ont été saignés une semaine après l'intoxication; une augmentation du titre antitoxique sanguin, en moyenne d'approximativement 40% a été constatée. On peut donc attribuer à l'intoxication le rôle d'une injection de rappel.

A part la résistance à la toxine, on a essayé la résistance des cobayes à l'infection aux spores. Ce lot comprend une partie des cobayes déjà intoxiqués, chez lesquels le titrage ultérieur a mis en évidence la hausse du titre sanguin, ainsi que le reste des cobayes immunisés.

Les cobayes soumis à l'infection ont été partagés en deux groupes et infectés avec des doses complètement différentes de spores.

Dans le premier lot, six cobayes avec des titres de 10—50 U.A./ml sérum, ont été infectés avec 150 D.C.L. spores. Un seul animal a survécu, les autres sont morts avec gangrène typique. Dans le second lot, les animaux présentant des titres antitoxiques entre 5—50 U.A./ml sérum ont été infectés avec 1—3 D.C.L. spores. De ce groupe ont survécu 15 de 18 (83%). Tous les cobayes de ce lot qui n'ont pas résisté, sont morts après 14—15 jours, alors que les 16 témoins qui avaient reçu 1 D.C.L. sont morts en 2—4 jours.

La majorité des cobayes (13 sur 18) ont fait des abcès au point d'inoculation, guérissant dans une ou plusieurs semaines après évidement manuel répété de l'abcès. Durant la période initiale des abcès, on a mis en évidence à l'examen direct et par ensemencement le *Cl. œdematiens* en culture pure; ultérieurement ces abcès se sont surinfectés avec des germes pyogènes banaux. La signification de ce phénomène immunobiologique sera discutée dans une note séparée. Pour le moment, nous nous limitons à mentionner le caractère bénin de ces abcès apparus chez les cobayes immunisés, d'où on a isolé en culture pure, des souches de haute toxicité (5 000 — > 10 000 D.L.M./ml).

3. *Immunisation des lapins.* Neuf lapins ont été immunisés avec l'anatoxine œdematiens concentrée, purifiée et adsorbée sur phosphate d'aluminium. Quatre

nimaux ont reçu trois injections de 0,1 ml anatoxine contenant 5 U.C. les utres recevant par trois injections de 1 ml du même antigène, soit 50 U.C.

Étant donné la différence très marquée de volume et de titre en U.C. de antigène — on peut constater une différence dans la réponse immunologique es animaux (Tableau II).

*Tableau II*

**Évolution du titre antitoxique sanguin moyen des lapins immunisés anti-oedematiens**

| Antigène injecté | | Titre antitoxique sanguin moyen UA/ml | | |
|---|---|---|---|---|
| Quantité | UC | 1-e inj. | 2-e inj. | 3-e inj. |
| 1 ml | 50 | 2 | 10 | 10 |
| 0,1 ml | 5 | 0,23 | 4 | 5 |

En général, tous les lapins immunisés ont présenté un titre moyen de 1 U.A. près la première injection, 6 U.A. après la seconde injection et 7,07 après la roisième (fig. No. 2).

Des résultats obtenus, il ressort ue pour les lapins aussi, la troisième njection n'est pas nécessaire. La seconde njection augmente sensiblement le titre noyen. L'antigène contenant 50 U.C. n dose de 1 ml, produit un titre protecteur même après la première injection, lors que le produit qui ne contient que U.C. en volume de 0,1 ml ne confère as de titre protecteur à 2 sur 4 animaux (<0,1 U.A./ml). Bien qu'une lifférence de réponse entre les deux ariantes se maintient aussi après la econde et troisième injection, néanmoins u point de vue de la protection conérée, ces différences, pratiquement ne omptent plus.

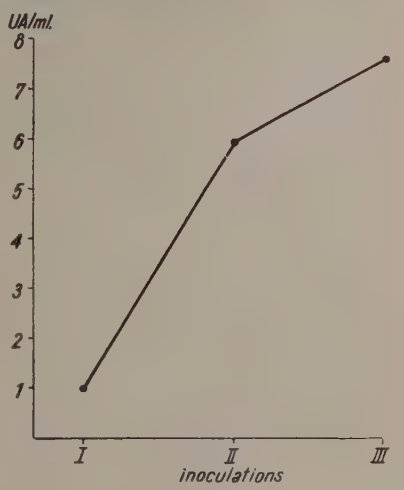



*Fig. 2.* — Évolution de la moyenne des titres antitoxiques sanguins chez les lapins immunisés à l'anatoxine oedematiens, en fonction du nombre d'inoculations.

4. *Immunisation des moutons.* Vingt noutons, séparés en deux groupes égaux, mmunisés avec le même antigène, ont eçu soit un 1 ml (50 U.C.), soit 0,5 ml 25 U.C.) produit adsorbé.

Après la première injection, tous es animaux ont donné des titres infélieurs à 0,5 U.A./ml sérum. Après la econde injection, les moutons ont donné un titre satisfaisant, soit un titre noyen général de 1,6 U.A./ml qui a varié entre 0,5 et 2—5 U.A./ml sérum anguin. Après la troisième injection on constate une ascension sensible des

titres antitoxiques, le titre moyen étant de 8,4 U.A./ml sérum, le titre minimum de 3 U.A./ml et le titre maximum de 40 U.A./ml.

Une certaine différence entre les réponses immunologiques, en fonction des doses antigéniques administrées est perceptible seulement après la seconde injection, et ne se met plus en évidence après la troisième (Tableau III).

*Tableau III*

**Réponse immunologique des moutons à la primo-vaccination, en fonction des doses antigéniques injectées**

| Antigène injecté | | Titre moyen antitoxique sanguin (UA/ml) | | |
|---|---|---|---|---|
| Volume | UC | 1-e injection | 2-e injection | 3-e injection |
| 1 ml | 50 | <0,5 | 2,0 | 8,7 |
| 0,5 ml | 25 | <0,5 | 1,25 | 8,1 |

L'évolution des titres antitoxiques sanguins chez les moutons a été contrôlée pendant 3 mois, par titrages répétés à 2 semaines d'intervalle, suivis d'un rappel, utilisant les mêmes quantités et doses antigéniques que pour la première vacci-

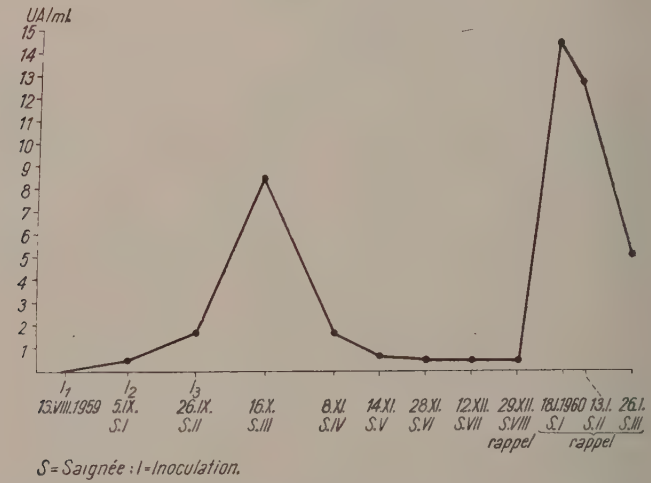



*Fig. 3.* — Évolution de la moyenne des titres antitoxiques sanguins au cours de la première immunisation, dans la période suivante et après rappel chez les moutons immunisés à l'anatoxine oedematiens.

nation. L'évolution des titres après la primo-vaccination et après le rappel peut être suivie dans le graphique no. 3.

On peut constater que la moyenne du titre antitoxique baisse après la première immunisation, rapidement au début, plus lentement ensuite, se mainte-

ıant à un titre minimum protecteur (au moins 0,1 U.A./ml) chez tous les moutons ›endant l'entière période de 3 mois (à partir de la première immunisation jusqu'au appel). Le rappel augmente en 10 jours la moyenne du titre de plus de 30 fois; a baisse du titre moyen est légère après les premiers 5 jours et plus accentuée près 15 autres jours, bien que le titre moyen continue à se maintenir à un ıiveau élevé (5 U.A./ml sérum sanguin).

★

Avant de passer à la discussion des résultats, nous mentionnons que les noculations n'ont provoqué à aucune des espèces animales des réactions généales ou locales, à part un nodule de grandeur variable qui s'est résorbé dans ıne ou plusieurs semaines.

## DISCUSSION

Les résultats de nos expériences sont en concordance avec ceux de tous ɛs auteurs, qui ont constaté que l'anatoxine œdematiens est la plus antigénique les anatoxines gangréneuses, ce qui fait que TYTELL et coll. (2) la comparent vec l'anatoxine tétanique.

Une première observation d'ordre général est celle que dans l'immunisaion anti-œdematiens, contrairement à l'immunisation active anti-vibrion septique t anti-perfringens, le troisième stimulus antigénique n'est nécessaire pour ucune des espèces animales étudiées. On a pu constater que, même une seule ıjection d'antigène produit un titre antitoxique sanguin protecteur, soit chez a majorité des individus (souris), soit chez la totalité, dans le cas d'un dosage orrespondant (cobayes et lapins).

En ce qui concerne l'influence des doses d'antigène exprimées en U.C. et n volumes, elle ne se perçoit que pour les très petites doses, et seulement au ours des deux premières injections. Si la dose dépasse 10 U.C. même une quanité minime de 0,1 ml de produit adsorbé est probablement efficace pour les ouris, cobayes et lapins, en une seule injection, et sûrement efficace en deux ıjections pour toutes les espèces animales étudiées.

En ligne générale, nos résultats ressemblent à ceux obtenus dans d'autres ays. Ainsi, AKATOV (5) obtient chez la souris, en 1958 une résistance d'envion 100% chez les animaux intoxiqués par 448 D.L.M.$_{50}$.

LETTL et coll. (14) expérimentant la résistance sur les souris qui avaient eçu 5—12—15 U.C. par voie intrapéritonéale, obtiennent une protection de 00% envers 50 D.L.M. alors que les souris ayant reçu 2 U.C. ne résistent qu'en roportion de 50% à la même dose. Du texte des auteurs ne ressort pas claireıent le nombre des injections administrées aux animaux. Nous rappelons ue, personnellement nous avons essayé la résistance des souris par 5—50 .L.M. les animaux — qui avaient reçu 1,5—20 U.C. — résistant en proportion e 90%.

En ce qui concerne les cobayes, la résistance à l'intoxication, enregistrée ar nous, et notamment de 100% à 50 — 500 D.L.M. ou 83% à 50 — 2500 D.L.M.

›*

dépasse toutes les données que nous avons rencontrées dans la littérature (Tytell et coll. (2) — 160 DLM par voie intrapéritonéale, 100 DLM par voie intramusculaire, Vîgodcikov, Volkova, Zelevinskaia (6) — 50—100 D.L.M. Manolov, Vranceva, Dancev (13) — 200 D.L.M. par voie intrapéritonéale /100%/, 200 D.L.M. par voie intramusculaire /50%/).

Pour ce qui en est de la résistance à l'infection des cobayes, nous n'avons trouvé que la communication d'Altmeier et coll. (4), qui obtiennent après trois injections un haut degré de protection chez 82—93% des cobayes immunisés par voie intramusculaire envers 1—1000 D.C.L. culture, et chez 60—63% envers les mêmes doses, en cas d'immunisation par voie souscutanée. Nous rappelons que les animaux vaccinés par nous ont résisté dans une proportion de 90% à l'infection avec 1—3 D.C.L. spores et qu'en vertu des considérations exposées dans la communication relative à l'immunisation active anti-perfringens (19), nous pouvons affirmer que l'épreuve de l'infection avec spores est de beaucoup plus sévère que celle de l'infection avec culture.

Quant aux résultats de l'immunisation active anti-œdematiens des lapins, les titres antitoxiques obtenus par nous, sont inférieurs à ceux obtenus par Akatov (9) — 18,54 U.A./ml — 84,26 U.A./ml après deux injections.

Ajoutons que nous n'avons pas trouvé des données dans la littérature concernant l'immunisation anti-œdematiens des moutons par des produits concentrés, purifiés et adsorbés.

Il résulte de nos expériences que toutes les espèces sont du type à réactivité immédiate vis-à-vis de l'antigène œdematiens, exception faite pour les moutons. Il est intéressant de souligner que cette espèce présente ultérieurement une augmentation continue du titre antitoxique, alors que les autres espèces — à réponse immunologique plus prompte — marquent une augmentation du titre antitoxique plus faible, ou bien aucune à partir de la deuxième à la troisième injection.

Tenant compte du fait que la réaction immunologique des moutons à l'immunisation perfringens (19) est presque inverse, la réaction ne semblerait pas appartenir à l'espèce animale comme telle, mais varierait selon la nature de l'antigène. Bernheimer (3), relativement à l'immunisation active avec divers antigènes gangréneux, a fait des observations similaires, non pas en relation avec des espèces différentes, mais avec des individus différents de la même espèce (homme).

Le fait que chez une espèce à réponse moins favorable (moutons) le titre moyen antitoxique se maintient à un niveau protecteur chez tous les animaux à partir de la primo-immunisation jusqu'au rappel, ainsi que la hausse considérable du titre après le rappel, nous autorisent à espérer que des résultats similaires pourront être obtenus aussi chez l'homme.

En général, si nous tenons compte des résultats très favorables obtenus dans l'immunisation de l'homme par les auteurs qui ont employé des produits antigéniques qui donnaient des résultats sur les animaux, pareils aux résultats obtenus par nous, nous sommes à même de considérer que les anatoxines œdematiens préparées par nous pourraient réaliser l'immunisation active de l'homme en tant que composant d'une polyanatoxine anaérobie.

RÉSUMÉ

1. Des animaux de laboratoire ont été immunisés expérimentalement avec l'anatoxine œdematiens concentrée, purifiée et adsorbée sur phosphate d'aluminium. Les toxines ayant en moyenne 15.000 D.L.M./ml se transforment en anatoxines avec 5 U.C./ml en moyenne, qui par concentration avec l'acide métaphosphorique donnent des produits contenant jusqu'à 250 U.C./ml.

2. Après adsorption en parties égales sur phosphate d'aluminium ayant 1,6 mg/ml, on immunise 250 souris, 60 cobayes, 9 lapins et 20 moutons. Après trois injections à 3 semaines d'intervalle, on obtient des titres antitoxiques sanguins de 3—15 U.A./ml, en moyenne 8,88 U.A./ml chez la souris, $>3<5->50$ U.A./ml., en moyenne 24,5 U.A./ml chez le cobaye, $3->10<15$ U.A./ml en moyenne 7,07 U.A./ml chez le lapin et 3—40 U.A./ml en moyenne 8,4 U.A./ml chez le mouton.

On constate que le titre antitoxique se maintient à un niveau protecteur chez tous les moutons pendant 3 mois après la première immunisation. Le rappel administré a ce moment, conduit à une augmentation de plus de 30 fois en 10 jours du titre moyen, ce dernier atteignant 14,2 U.A./ml. Trente jours après le rappel, le titre antitoxique se maintient élevé chez tous les animaux.

Les souris immunisées ont résisté dans une proportion de 90% à 5—50 D.L.M. toxine, et les cobayes en proportion de 100% à 50—500 D.L.M. et 83% à 50—2500 D.L.M. toxine et, dans une proportion de 83% à 1—3 D.C.L. spores en solution de chlorure de calcium.

On ne constate pas d'autres réactions locales ou générales, que la formation d'un nodule au point d'injection, de dimensions variables, qui se résorbe progressivement en quelques semaines.

3. On constate qu'à part les moutons, les autres espèces possèdent une réactivité immédiate vis-à-vis de l'antigène œdematiens, une seule injection en dose suffisante produisant un titre antitoxique protecteur. Pour toutes les espèces animales, deux injections antigéniques sont suffisantes pour produire un titre antitoxique élevé chez tous les individus.

4. Les résultats obtenus autorisent l'espoir de pouvoir réaliser l'immunisation active anti-œdematiens chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dible J. H., Maclennan J. D. et Barber M. — Recent advances in Bacteriology. 3-e éd. Londres, 1951
2. Tytell A. A. et coll. — J. Immunol., 1947, **55**, 233.
3. Bernheimer A. — J. Immunol., 1947, **56**, 317.
4. Altemeier W. A. et coll. — Arch. Surg. 1952. **65**, 633.
5. Akatov A. K. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1958, No. 3, 71.
6. Vîgodcikov G. V., Volkova Z. M. et Zelevinskaia S. A. — Assoțiirovannîe profilakticeskie preparatî protiv ranevîh infekții. Moscou, 1959, 3—18.
7. Lebedeva Z. I. et Vlasova E. V. — Idem, p. 37.
8. Blagovescenski V. A. et Kuzima A. P. — Idem, p. 141—149.
9. Akatov A. K. — Idem, p. 149—159.
10. Akatov A. K. — Idem, p. 167—175.
11. Cerkas G. P. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1958. No. 7. 60.
12. Cerkas G. P. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1959. No. 9. 90.
13. Manolov D., Vranceva S. et Dencev V. — Communication au Symposium International d'Immunologie, Opatija, 1959.

14. Lettl A. et coll. — Communication au Symposium International d'Immunologie, Opatija, 1959.
15. Bittner J. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 417.
16. Kranzdorf H. et Bittner J. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 426.
17. Bittner J. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 49.
18. Bittner J. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 181.
19. Olaru A., Bittner J., Kranzdorf H., Voinesco V. et Tulburi A. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**,
20. Kranzdorf H. et Banc S. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 579.

## ИЗУЧЕНИЕ АНАЭРОБНОГО ПОЛИАНАТОКСИНА

### II. АКТИВНАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ АНАТОКСИНОМ ЭДЕМАТИЕНС, ОЧИЩЕННЫМ, КОНЦЕНТРИРОВАННЫМ И АДСОРБИРОВАННЫМ НА ФОСФАТЕ АЛЮМИНИЯ.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Лабораторные животные иммунизировались в экспериментальных условиях анатоксинами эдематиенс, концентрированными, очищенными и адсорбированными на фосфате алюминия. Токсины, содерживающие в среднем 15.000 М.Л.Д/мл, превращаются в анатоксины, содерживающие в среднем 5 ЕС/мл, которые путем концентрирования при помощи метафосфорной кислоты дают препараты, содерживающие до 250 ЕС/мл.

2. После адсорбции на равном количестве фосфата алюминия, содерживающего 16 мг/мл, иммунизировали 250 мышей, 60 морских свинок 9 кроликов и 20 овец. После трехкратной вакцинации с трехнедельными интервалами получены следующие антитоксические титры в крови: 3—15 АЕ/мл, в среднем 8,88 АЕ/мл у мышей, $>3<5$ — 50 А.Е./мл, в среднем 23,5 АЕ/мл у морских свинок. 3 — $>10<15$ АЕ/мл, в среднем 7,07 АЕ/мл у кроликов и 3—40 АЕ/мл, в среднем 8,4 АЕ/ мл у овец.

Установлено, что антитоксический титр сохраняется у всех овец на уровне обеспечивающем защиту, в течении 3 месяцев после первичной иммунизации. Ревакцинация, проведенная в данный момент, вызывает повышение в течении 10 дней среднего титра, который увеличивается больше чем в 30 раз, доходя до 14,2 АЕ/мл. Спустя 30 дней от ревакцинации антитоксический титр остается на высоком уровне у всех животных.

Иммунизированные мыши устояли в 90% против 5—50 М.Л.Д токсина, а морские свинки устояли в 100% против 50—500 МЛД и в 83% против 5 –2500 МЛД токсина и в 83% против 1—3 ДС споров, введенных с раствором хлористого кальция.

Не отмечены местные или общие реакции кроме образования узелков разных размеров на месте введения; эти узелки постепенно рассасываются в течении нескольких недель.

3. Установлено, что за исключением овец, все остальные виды животных быстро реагируют на антиген эдематиенс, так как однократная вакцинация хорошо выбранной дозой обеспечивает у всех видов животных высокий антитоксический титр у всех привитых особ.

4. Полученные результаты дают надежду в отношении возможности осуществить активную иммунизацию противэдематиенс у людей.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER EIN POLYANAEROBENTOXOID

### II. EXPERIMENTELLE AKTIVE IMMUNISIERUNG MIT EINEM KONZENTRIERTEN, GEREINIGTEN UND AN ALUMINIUMPHOSPHAT ADSORBIERTEN OEDEMATIENSTOXOID.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Laboratoriumstiere wurden experimentell mit einem konzentrierten, gereinigten und an Aluminiumphosphat adsorbierten Oedematienstoxoid immunisiert. Aus Toxinen mit einem mittleren Gehalt von 15.000 DLM/ml wurden Toxoide mit einem mittleren Gehalt von 5 Lb/ml gewonnen, welche durch Konzentrierung mit Metaphosphorsäure, Präparate von bis zu 250 Lb/ml ergaben.

2. Nach Adsorption in gleichen Teilen an Aluminiumphosphat (16 mg/ml), wurden 50 Mäuse, 60 Meerschweinchen, 9 Kaninchen und 20 Schafe immunisiert. Nach 3 Einspritzungen in Abständen von 3 Wochen wurden folgende Antitoxintiter im Blut erzielt: bei Mäusen, 3—15 AE/ml, mit einem Mittelwert von 8,88 AE/ml; bei Meerschweinchen, von Minimalwerten zwischen 3 und 5 bis zu Maximalwerten von über 50 AE/ml, mit einem Mittelwert von 24,5 AE/ml; bei Kaninchen, von 3 bis zu Maximalwerten zwischen 0 und 15 AE/ml, mit einem Mittelwert von 7,07 AE/ml; bei Schafen, 3—40 AE/ml, mit einem Mittelwert von 8,4 AE/ml.

Bei allen Schafen erhielt sich der Antitoxintiter während drei Monaten nach der ersten Immunisierung auf einer schutzverleihenden Höhe. Eine neuerliche, in diesem Augenblick reichreichte Einspritzung, führte im Verlauf von 10 Tagen zu einem über dreissigfachen Anstieg des mittleren Titers, der 14,2 AE/ml erreichte. Dreissig Tage nach dieser Einspritzung erhält sich der Antitoxintiter bei allen Tieren hoch.

Von den immunisierten Mäusen widerstanden 90% der Einspritzung von 5—50 DLM Toxin und von den Meerschweinchen, 100% der Einspritzung von 50—2500 DLM Toxin und 83% der Einspritzung von 1—3 DCL Sporen in Kalziumchloridlösung.

Ausser der Bildung eines Knötchens von schwankender Grösse an der Injektionsstelle, das im Verlauf einiger Monate resorbiert wird, konnten keine örtlichen oder Allgemeinreaktionen beobachtet werden.

3. Mit Ausnahme der Schafe, wiesen die untersuchten Tierarten eine sofortige Ansprachbarkeit auf Oedematiensantigen auf, d. h. eine einzige Einspritzung einer ausreichenden Antigenmenge rief einen schützenden Antitoxintiter hervor. Zwei Einspritzungen genügen bei allen Tierarten, um bei allen Individuen hohe Antitoxintiter hervorzurufen.

4. Die erhaltenen Ergebnisse berechtigen die Hoffnung ein Verfahren der aktiven Oedematiensimmunisierung beim Menschen ausarbeiten zu können.

## INVESTIGATIONS CONCERNING AN ANAEROBE-POLYTOXOID

### I. EXPERIMENTAL ACTIVE IMMUNIZATION WITH A CONCENTRATED AND PURIFIED OEDEMATIENS TOXOID ADSORBED ON TO ALUMINIUM PHOSPHATE.

SUMMARY

1. Laboratory animals have been experimentally immunized with concentrated and purified oedematiens toxoids adsorbed on to aluminium phosphate. Toxins containing an average 15.000 DLM/ml were transformed into toxoids with a mean content of 5 Lb./ml. which by concentration and purification with metaphosphoric acid yielded products containing up to 250 Lb./ml.

2. After adsorbtion on to an equal amount of aluminium phosphate suspension containing 16 mg./ml. ,250 mice, 60 guinea-pigs, 9 rabbits, and 20 sheep were immunized by 3 inoculations at 3 weeks' intervals. The antitoxic titres ranged, in mice, from 3 to 5 A.U./ml., with an average of 8.88 A.U./ml.; in guinea-pigs, from levels between 3 and to levels above 50 A.U./ml. with an average of 24.5 A.U./ml.; in rabbits, from 3 A.U./ml. up to levels between 10 and 15 A.U./ml., with an average of 7.07 A.U./ml.; and in sheep, from 3 to 40 A.U./ml., with an average of 8.4 A.U./ml.

The antitoxic titre was found to persist at a protecting level in all the sheep for a period of 3 months following immunization. A booster inoculation administered at that moment induced an over 30 fold increase of the mean titre which reached 14.2 A.U./ml. within 10 days. Thirty days after the booster injection the antitoxic titres were still high in all animals.

Ninety per cent of the immunized mice resisted 5—50 D.L.M. of toxin, while all of the guinea-pigs resisted 50—500 D.L.M. of toxin and 83 per cent resisted 1—3 D.C.L. of spores in a calcium chloride solution.

Except for the formation of nodules of various sizes at the site of the inoculation, no local or systemic reactions were recorded; the nodules were gradually resorbed within a few weeks.

3. All the animal species tested, excepting sheep, displayed an immediate responsiveness to œdematiens toxoid, a single inoculation being required in order to induce a protecting antitoxic titre. Two inoculations will result in high antitoxic titres in all animals of all species.

4. The results obtained justify the hope that a method of performing active anti-œdematiens immunization might be adapted to human subjects as well.

# SSAIS EN VUE D'OBTENIR DES SUSPENSIONS D'ANTIGÈNE «Vi» A EFFICACITÉ PROLONGÉE

par

E. Crăcea

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Entérobactériacées)*

— Manuscrit reçu le 11 janvier 1960 —

La pratique, sur une grande échelle, de la réaction d'agglutination Vi pré-nte actuellement l'inconvénient de l'instabilité des deux types de suspensions i — formolée et vivante — couramment utilisées. En effet, la suspension Vi vante doit être préparée le jour même où on effectue la réaction, alors que suspension formolée, malgré son efficacité prolongée, perd au bout de quel-ues mois le pouvoir agglutinant et ceci d'autant plus rapidement que la tem-rature de conservation de l'antigène est plus élevée.

Dans le présent travail, on essaye d'obtenir des suspensions Vi qui, con-rvées le plus longtemps possible, soient capables de maintenir leur aggluti-bilité par le sérum anti-Vi. Ces antigènes préparés d'après une technique rsonnelle, sont étudiés en comparaison avec les suspensions Vi — formolée au chlorure de calcium, décrites par d'autres auteurs (1, 5, 6).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Souche microbienne.* Pour la préparation des suspensions Vi, on a utilisé la uche Vi I Bhatnagar. Effectuant des dispersions sur gélose Lablemco, on choisi 3 colonies, testées par agglutination en tubes vis-à-vis d'un sérum Vi llerup. Pour la préparation ultérieure des suspensions Vi, on a utilisé la colonie i a le mieux agglutiné avec ce sérum. Ainsi, pour chaque suspension, on a t, à partir de la souche Vi Bhatnagar, des cultures de 20 heures à 37°, sur îtes Roux avec gélose, 2%, pH = 7,4, préparées avec la peptone Merck. Les chniques de la préparation ultérieure des suspensions de ces cultures, seront crites plus loin.

On a étudié comparativement les suspensions Vi : formolée, en solution persaline, acétonée, au chlorure de calcium, en dioxan et suspension Vi avec ycocolle.

## TECHNIQUE DE PRÉPARATION DES SUSPENSIONS Vi.

1. Suspension Vi formolée 2‰ (d'après la technique du Service des Enté-bactériacées): la culture de chaque boîte Roux est suspendue en solution ine physiologique (9‰), formolée 2‰, avec du formol commercial 40%, nsidérée comme unité; concentration finale de 6 mlrd. germes/ml. Celle-ci

est ramenée, au moment de l'épreuve d'agglutination Vi — à l'aide de la solution physiologique — à une concentration de 750—800 millions germes/ml.

2. Suspension Vi en solution hypersaline: le liquide des boîtes Roux est éliminé et la culture suspendue en solution Na Cl 50‰, formolée 2‰; concentration finale des germes — 5 mlrd./ml. Au moment de son utilisation, l'antigène est dilué 1/6 en eau distillée, en vue d'atteindre la concentration saline des autres suspensions Vi. Il a été nécessaire de la formoler, étant donné que la culture de *b. typhiques* n'est pas tuée par simple suspension en solution hypersaline.

3. Suspension Vi acétonée: on élimine le liquide de la boîte Roux et on lave la culture avec une solution d'acétone 50%, en solution saline physiologique, à l'aide de perles de verre stériles. Avec cette même solution d'acétone 50%, la suspension est ramenée à une concentration de 6 mlrd germes/ml. Au moment du test, on dilue avec une solution saline physiologique, à une concentration de 750—800 millions germes/ml. L'essai de préparer une suspension Vi en acétone non-diluée n'a pas donné de résultats, les germes étant précipités.

4. Suspension Vi au chlorure de calcium: la culture de 20 heures de Vi I Bhatnagar est suspendue en solution saline physiologique, à une concentration de 7 mlrd. germes/ml. De cette dernière, on prépare une suspension Vi avec du chlorure de calcium, selon la technique décrite par Ando et Shimojo (1):

| | |
|---|---|
| suspension saline de germes (7 mlrd./ml.) | 50 ml. |
| solution Ca $Cl_2$ 20% | 12,5 ml. |
| formol commercial (40%) | 2,5 ml. |
| solution saline physiologique | 435 ml. |

On obtient ainsi, une suspension Vi au chlorure de calcium, dans une concentration de 700 millions germes/ml., conservée et utilisée comme telle.

5. Suspension Vi en dioxan (diéthylenoxyde): on éloigne le liquide des boîtes Roux et on lave la culture à l'aide de perles de verre, avec solution de dioxan 50% en solution saline physiologique + glycocolle 1%, concentration finale (pour éviter la précipitation du glycocolle, on le dissout d'abord en solution physiologique, ajoutant ensuite le dioxan). La suspension est ramenée avec la même solution, à la concentration de 5 mlrd. germes/ml. Au moment de l'utilisation, on dilue avec solution saline physiologique jusqu'à la concentration de 750—800 millions germes/ml. On a employé le glycocolle en vue de son action stabilisatrice des solutions de protéines, par l'augmentation de leur constante diélectrique. En absence du glycocolle, la solution de dioxan, même en concentration de 50% donnait de fausses réactions positives de l'antigène témoin. Le glycocolle, bien qu'habituellement indiqué en concentration de 2,25 g % comme stabilisateur de protéines, est utilisé, dans le cas présent, en concentration de 1%, étant donné que dans une concentration dépassant 1% il se dissout imparfaitement dans la solution donnée de dioxan.

6. Suspension Vi avec glycocolle 2,25%: on lave la culture des boîtes Roux avec une solution de glycocolle 2,25%, en solution saline physiologique, formolée 2‰. Concentration finale — 7 mlrd. germes/ml., et ramenée, au moment de l'utilisation, avec une solution physiologique, à une concentration de 750—800 millions germes/ml. La solution en glycocolle n'étant pas stérilisante pour les b. typhiques a dû être formolée. Toutes les suspensions Vi décrites ont été

ardées 1 jour à la température du laboratoire et ensuite 3 jours à +4°C. Les ontrôles ultérieurs ont montré que les suspensions étaient stériles, et stables la dilution en solution saline physiologique.

### ÉTUDE COMPARATIVE DES SUSPENSIONS Vi

Chaque suspension Vi a été partagée en deux lots, dont l'un conservé à +4°C, pendant 9 mois et l'autre durant le même intervalle, *à* la température u laboratoire (10°—24°C).

Les suspensions Vi ont été étudiées comparativement, à l'aide des réactions agglutination et de précipitation. La réaction d'agglutination a été effectuée vec un sérum anti-Vi I BHATNAGAR (titre 1/1600) et un sérum anti-Vi *Ballerup* itre 1/1000). Les tests répétés des deux sérums, envers la souche Vi BHATNAGAR, nt montré un titre constant, durant toute la période d'observation. La réaction e précipitation a été faite avec des sérums anti-Vi *Ballerup*, récemment réparés, en vue d'obtenir un titre précipitant satisfaisant. Les sérums ont été stés par une réaction de précipitation avec un antigène trichloracétique Vi, réparé à partir d'un bacille Coli avec antigène Vi [1]), leur titre variant autour e 1/800. Pour cette réaction, on a utilisé des sérums dilués 1/5, en volume e 0,2 ml, additionnés de 0,2 ml suspension Vi diluée, cette dernière repré-ntant le surnageant, séparé après centrifugation d'une épreuve de la suspen-on Vi à étudier.

### RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.

Les graphiques 1—6 donnent les résultats comparatifs des diverses ıspensions Vi, gardées à +4°C et à la température du laboratoire, étudiées par s réactions d'agglutination et précipitation. Les tests ont été effectués chaque ois, par réaction d'agglutination et à 1, 3, 5 et 9 mois après la préparation, ır réaction de précipitation.

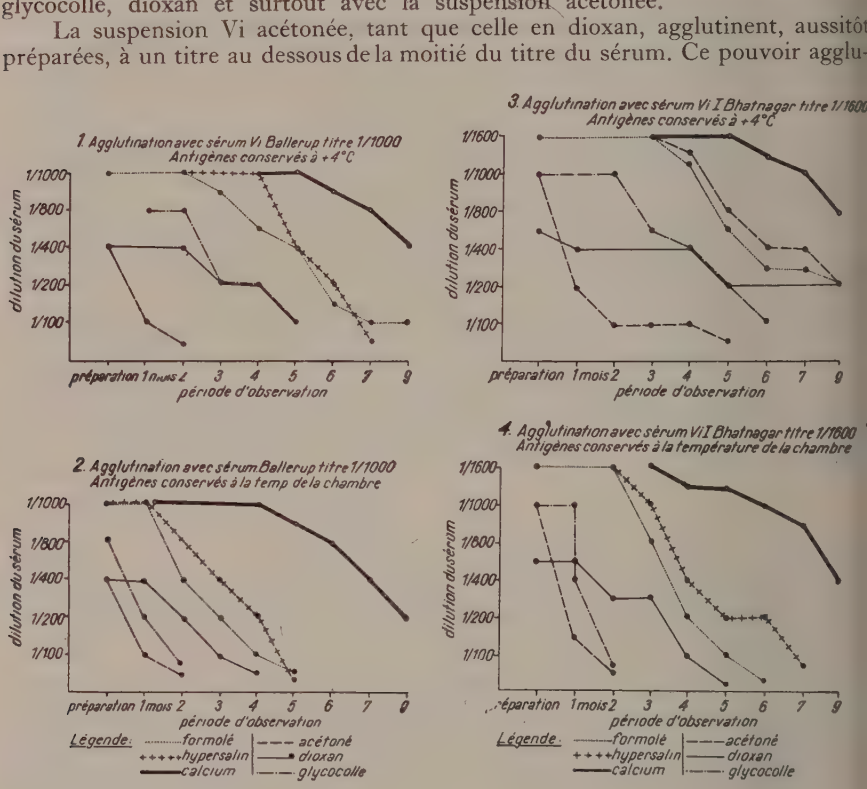
Les résultats de la réaction d'agglutination avec le sérum Vi *Ballerup* ontrent le comportement, du point de vue stabilité, des différentes suspensions i étudiées comparativement, ainsi qu'en fonction de la température de nservation. La suspension Vi formolée garde son titre initial, pendant 3 mois, rsqu'elle est conservée à +4°C et seulement 1 mois à la température du labo-toire. Ces données se rapprochent de celles d'une série de travaux devenus assiques (2, 5, 6, 7, 8, 11), selon lesquels l'action préservante de l'antigène i en suspension formolée serait supérieure à celle de la suspension saline simple, ci étant valable seulement dans des conditions de conservation au froid de suspension Vi formolée. La suspension Vi hypersaline, donne des résultats peu près similaires. Bien que, conservée au froid, cette suspension Vi épasse d'un mois (4 mois) la limite de conservation du titre agglutinant initial la suspension formolée (3 mois), ultérieurement, cette agglutinabilité diminue ut aussi rapidement. À la température du laboratoire, son comportement t pareil à celui de la suspension formolée. Ceci nous fait supposer que la

[1]) L'antigène Vi trichloracétique a été mis à notre disposition grâce à l'obligeance de r. Ecaterina Papazian, du Service de Physiologie microbienne de l'Institut « Dr. I. Canta-zino ».

conservation de l'antigène Vi en solution hypersaline est due plutôt au formol, ajouté en vue de stériliser la suspension de germes.

Les résultats les plus faibles ont été obtenus avec les suspensions Vi en glycocolle, dioxan et surtout avec la suspension acétonée.

La suspension Vi acétonée, tant que celle en dioxan, agglutinent, aussitôt préparées, à un titre au dessous de la moitié du titre du sérum. Ce pouvoir agglu-




tinant faible continue à baisser, au cours des 1—2 mois suivants. Quant à l suspension Vi acétonée, nos données diffèrent de celles de GIOVANARDI (8 Préparant une suspension Vi acétonée 50%, cet auteur constate, en limitan toutefois la période d'observation à deux mois, qu'après cet intervalle, un suspension Vi acétonée 50%, gardée à + 4°C et à 18°C, ne présente pas de modi fications importantes du pouvoir agglutinant avec un sérum anti-Vi. Des donnée de la littérature, il ressort que l'acétone est indiquée surtout pour la stérilisatio des préparations d'antigène Vi, ultérieurement séchées par divers procédé (10, 12, 13). À l'état sec, les germes conservent leur pouvoir agglutinant ave un sérum Vi, au moins pendant 9 mois (13).

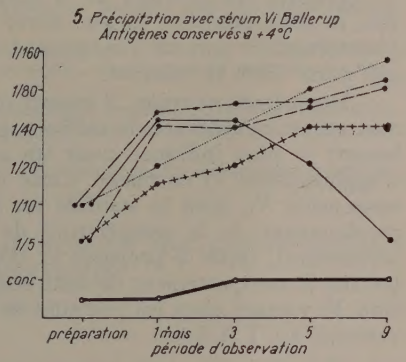
Pour la suspension Vi en glycocolle, le titre agglutinant, bien qu'élevé a moment de la préparation, baisse au dessous de la moitié du titre du sérum après conservation de 3 mois à + 4°C et 1 mois à la température du laboratoir

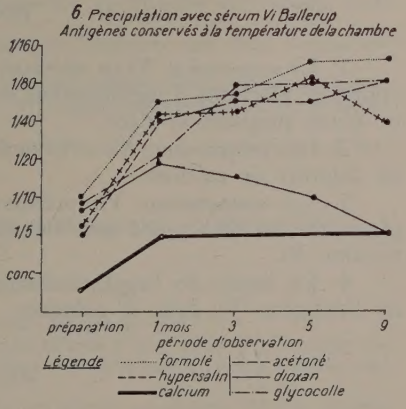
Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la suspension Vi, préparée
ı chlorure de calcium, qui a conservé, pendant 6 mois, le titre qu'elle avait
ı moment de la préparation (même titre que la suspension vivante Vi I BHAT-
AGAR), tant à + 4°C, qu'à la température du laboratoire.

Des résultats similaires à ceux obtenus par agglutination des suspensions
i avec un sérum Vi *Ballerup*, ont été
onstatés par leur test vis-à-vis d'un
ɛrum préparé avec la souche Vi
BHATNAGAR.

Grâce à la réaction de précipitation,
ı a remarqué, pour toutes les suspen-
ons Vi, excepté celle au chlorure de
ılcium, un passage net de l'antigène Vi
ans la solution. Ce passage présente une
ausse brusque, au cours du premier
ois après la préparation, suivie par
ne augmentation, lente mais continue,
endant toute la période d'observation.
faut noter que les tests effectués au
ours des premiers 3 mois d'observa-
on, ont montré que les suspensions Vi
- formolée et hypersaline — gardées à
- 4°C et maintenant leur titre agglu-
nant initial—avaient un titre précipitant
lus bas que celui des suspensions avec
ɛétone, dioxan ou glycocolle; conservées
la température du laboratoire, ces sus-
ensions présentent, elles aussi, un titre
récipitant plus élevé, en même temps
u'une baisse marquée du pouvoir ag-
lutinant.

La suspension Vi, préparée en so-
ıtion avec chlorure de calcium, ne donne
es réactions de précipitation que non
iluée, lorsqu'elle est gardée à + 4°C,
ı diluée 1/5 — à la température du
boratoire.




On ne peut établir une relation
'ordre quantitatif entre le pouvoir agglutinant de la suspension Vi totale et le
ouvoir précipitant du liquide de suspension des germes (courbe plus abrupte de
hausse du pouvoir précipitant, au cours du premier mois après la préparation,
uand généralement les antigènes maintiennent leur titre agglutinant non chan-
é). On constate un comportement différent pour la suspension Vi en dioxan,
ont le titre précipitant baisse, au bout de quelques mois. Il se peut que le
ioxan ne réussisse à conserver intact même l'antigène Vi, passé dans la
olution.

Les faits mentionnés ci-dessus, et surtout celui que justement la suspension
i qui conserve plus longtemps son pouvoir agglutinant (suspension Vi au

chlorure de calcium), soit celle qui donne une réaction de précipitation seulement avec la suspension Vi concentrée, nous semblent présenter des arguments en plus, à l'appui de l'hypothèse émise par divers auteurs, soutenant que l'absence d'agglutinabilité des diverses préparations d'antigène est dû au passage de cet antigène dans la solution (3, 7, 9, 14).

D'après les données de la littérature consultée, ce travail représente, en fait, la seule étude de longue durée d'une série de préparations d'antigène Vi poursuivant le sort de l'antigène de la surface des germes, ainsi que de celui qui passe dans la solution.

Du présent ouvrage, il ressort que la préservation de l'antigène Vi en solution saline au chlorure de calcium, proposée par ANDO et SHIMOJO, est actuellement la plus indiquée pour un antigène liquide, utilisé pour les réactions d'agglutination Vi en masse. Cette méthode présente l'avantage de fournir une suspension Vi, dont la stabilité est assurée pour une période de 6 mois, indépendamment de la température de conservation (+ 4°C ou température du laboratoire), facile à préparer et d'un prix modéré. Reste à contrôler, sur le terrain, le comportement de cette suspension Vi, en comparaison avec la suspension Vi vivante chez les porteurs de b. typhiques et chez les sujets sains, non vaccinés au T.A.B.

## CONCLUSIONS

1. La suspension Vi au chlorure de calcium, est très indiquée pour l'exécution de réactions d'agglutination Vi, en masse, offrant l'avantage de la stabilité et d'une préparation aisée.

2. Les suspensions Vi — formolée et hypersaline — sont inférieures à celle au chlorure de calcium.

3. Les suspensions Vi, préservées en acétone, dioxan, solution saline au glycocolle, ne sont point satisfaisantes, en ce qui concerne la réaction d'agglutination Vi.

4. La baisse de l'agglutinabilité d'une suspension Vi est due au passage de l'antigène Vi dans la solution.

## BIBLIOGRAPHIE

1. ANDO K. et SHIMOJO H. — Bull. O.M.S., 1953, **9**, 4, 575.
2. BHATNAGAR S. S., SPEECHELY G. I. et SINGH M. — J. Hyg., 1938, **38**, 663.
3. CARLINFANTI E. — Ann. Inst. Pasteur, 1946, **72**, 766.
4. CHU G. I. D., HOYIT R. E. et PICKETT M. J. — J. Hyg., 1956, **54**, 585.
5. FELIX A. et PITT M. — Lancet, 1934, **227** 186.
6. FELIX A. et PITT M. — J. Hyg., 1935, **35**, 428.
7. FELIX A. et BHATNAGAR S. S. — Brit. J. exp. Pathol., 1935, **16**, 422.
8. GIOVANARDI A. — Ztschrft. f. Hyg. u. Infektkr., 1938, **120**, 273.
9. JUDE A. — Biologie Médicale, 1950, **39**, 318.
10. LANDY M. — Am. J. Hyg., 1953, **58**, 148.
11. LIEB F. — Wien. Med. Wschrft., 1955, 35/36, 710.
12. PELUFFO C. A. — Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1941, **48**, 340.
13. SCHOLTENS R. Th., COHEN H. et NOOY J. A. — Antonie van Leuwenhoeck, 1956, **22**, 21
14. YAMANE I. et TOHOKU — J. exp. Med., 1952, **55**, 167 (Bull. Inst. Pasteur, 1953 p. 1148.)

## ПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНОВ «Vi» ГОДНЫХ В ТЕЧЕНИИ БОЛЕЕ ДЛИТЕЛЬНОГО СРОКА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ.

Из изложенной работы следует:

1. Антиген «Vi», обработанный хлористым кальцием является отличным антигеном я массового проведения реакции «Vi». Преимущества данного антигена сказываются его стойкости и в легкости изготовления.

2. Антиген «Vi», обработанный формалином, так-же как и антиген, содержащий льшие концентрации повареной соли, уступает антигену, обработанному хлористым кал-ем.

3. Антигены «Vi», сохраняемые при помощи ацетона, диоксана, соленного расствора икоколя не удовлетворяют требованиям применения в качестве антигенов для реакции глютинации «Vi».

4. Снижение агглютинируемости суспензии « Vi» объясняется переходом антигена i» в расствор.

## ERSUCHE ZUR GEWINNUNG VON „Vi„-ANTIGENEN MIT LANGE ANHALTENDER WIRKSAMKEIT

ZUSAMMENFASSUNG

Aus der obigen Arbeit ergibt sich folgendes:

1. Das „Vi"-Antigen mit Kalziumchlorid stellt ein sehr gutes „Vi"-Antigen für die assenausführung von „Vi„-Reaktionen dar. Es bietet den Vorteil eines beständigen, leicht rstellbaren Antigens.

2. Mit Formol behandelte und hypersalzhaltige „Vi"-Antigene sind dem Antigen mit lziumchlorid unterlegen.

3. „Vi"-Antigene in Azeton, Dioxan, oder gkykokollhaltiger Kochsalzlösung sind in zug auf ihre Verwendung als Antigene bei der „Vi"-Agglutinationsreaktion nicht befrie-end.

4. Die Abnahme der Agglutinierbarkeit einer „Vi"-Aufschwemmung beruht auf dem ergang des „Vi"-Antigens in die Lösung.

## ATTEMPTS TO OBTAIN „Vi" ANTIGENS POSSESSING A PROLONGED EFFICACY

SUMMARY

The following conclusions may be drawn from the foregoing work:

1. „Vi" antigen associated with calcium chloride affords a very good „Vi" antigen for large-scale performance of „Vi" reactions. It offers the advantage of being a stable and dily preparable antigen.

2. Formol-treated and hypersaline „Vi" antigen are inferior to calcium chloride antigen.

3. „Vi" antigens preserved in acetone, dioxan, or saline glycine solution are unsatisfactory regards their use as antigens in the „Vi" agglutination reaction.

4. The decrease of agglutinability of „Vi" suspensions is due to solubilization of the i" antigen.

Intreprinderea Poligrafică nr. 4, Calea Şerban Vodă nr. 133 — Bucureşti